

造血幹細胞移植の細胞取扱い に関するテキスト（第2版）

日本輸血・細胞治療学会

造血幹細胞移植関連委員会

「院内における血液細胞処理のための指針」および

「造血幹細胞移植の細胞取扱いに関するテキスト」

改訂タスクフォース

2025年3月版

目次

1 章	指針の概要と本テキストの目的	田野崎隆二、長村登紀子
2 章	基本となる QMS の考え方について	藤原実名美、池本純子、岩木啓太
3 章	骨髄採取	原口京子、池田和彦
4 章	細胞採取	
4.1 章	アフェレーシスによる細胞採取の基本	吉原哲、新井康之
4.2 章	末梢血幹細胞採取	山崎理絵、上田恭典、村田真由美
4.3 章	CD34 陽性細胞数の測定	原口京子、高橋敦子
4.4 章	コロニーアッセイ法	長村登紀子、尾上和夫
4.5 章	リンパ球採取	新井康之、山崎理絵
4.6 章	顆粒球採取	池本純子、大原喜裕、吉原哲
4.7 章	体外フォトフェレーシス	城友泰、新井康之
5 章	細胞処理	
5.1 章	細胞処理の基本	長村登紀子、新井康之
5.2 章	細胞処理の基本的操作	長村登紀子、新井康之
5.3 章	骨髄液の処理（プロセッシング）	奥山美樹、岸野光司
5.4 章	末梢血幹細胞の凍結保存	岸野光司、五十嵐靖浩
5.5 章	骨髄・幹細胞・その他製剤の解凍	奥山美樹、新井康之
5.6 章	幹細胞輸注および合併症	池田和彦、城友泰
6 章	電子カルテあるいは部門システムによる 血液細胞製剤の管理	山崎理絵、新井康之

序文

本テキストは 2015 年に初版されたものであり、輸血部門における造血細胞移植に関わる日々の業務において活用されてきた。その後 10 年の大きな変化として、免疫細胞療法である CAR-T 細胞療法が臨床の現場に導入され、現在では再発・難治性の B 細胞腫瘍における標準治療の一つとなった。欧米ではアフェレーシス部門や細胞プロセッシング部門が独立して存在する場合もあるが、本邦の CAR-T 導入施設の多くでは、もともと輸血部門であり、造血細胞移植の発展とともに輸血・細胞治療部門となった部門がアフェレーシスから CAR-T 細胞製品の取り扱いに至るまで本治療の要となって支えている。また、CAR-T 細胞療法の導入を一つのきっかけとして、輸血・細胞治療部門における品質マネジメント(QMS)の導入の重要性についても明らかとなった。QMS の考え方は、CAR-T 細胞療法を導入していない施設の輸血部門にとっても有用と思われる。また、間葉系細胞(MSC)製剤や CAR-T などの細胞製剤をこれまでの輸血部門のシステムを活用してどう運用するかという課題も生まれた。さらに、体外フォトフェレーシスといった新たな治療法も登場している。

これらを背景として、日本輸血・細胞治療学会の造血幹細胞移植関連委員会に属する「院内における血液細胞処理のための指針」および「造血幹細胞移植の細胞取り扱いに関するテキスト」改訂タスクフォースにおいて、本テキストを通じて輸血・細胞治療部門の現場の皆様へ最新の情報をお届けしたいという機運が高まり、今回の改訂につながった。執筆者の先生方、そして膨大な編集作業の大部分を担って下さった京都大学医学部附属病院・細胞療法センターのメンバー各位には深くお礼申し上げる次第である。

なお本テキストに関しては、現場に則したものとなるよう、執筆者の所属施設での経験を記載して頂いている。そのため、ガイドラインとしての性質をもつものでなく、各施設の責任でご使用いただきたい。また、本テキストは、今後も「成書」ではなく生きたテキストとして、適宜アップデートしていきたいと考えており、ぜひフィードバック頂ければ幸いである。

2025 年 3 月

日本輸血・細胞治療学会 造血幹細胞移植関連委員会
「院内における血液細胞処理のための指針」および
「造血幹細胞移植の細胞取り扱いに関するテキスト」改訂タスクフォース
吉原 哲・新井 康之

章の比較と主な改訂点

【初版目次】

- 1 骨髄採取
- 2 末梢血幹細胞採取
- 3 末梢血幹細胞採取における看護師の役割
- 4 骨髄バンクドナーのコーディネートについて
- 5 院内における血液細胞処理のための指針の概要
- 6 衛生・保存管理・環境整備
- 7 細胞処理の基本的操作と生細胞数の測定
- 8 CD34 陽性細胞数の測定
- 9 コロニー培養とコロニー形成細胞の測定
- 10 末梢血幹細胞の処理と凍結保存
- 11 骨髄液からの赤血球除去
- 12 骨髄液の血漿除去
- 13 造血幹細胞の融解と輸注
- 14 輸血管理システムを利用した造血幹細胞の管理
とバイオビジランス
- 15 骨髄バンクを介する骨髄細胞、ドナーリンパ球、
末梢血幹細胞の取り扱い
- 16 輸血における顆粒球の取り扱い
- 17 海外における細胞処理ガイドラインおよび
規制の現状

【第2版目次】

- 1 指針の概要と本テキストの目的
- 2 基本となる QMS の考え方について <新規>
- 3 骨髄採取 <改訂>
- 4 細胞採取
 - 4.1 アフェレーシスによる細胞採取の基本 <新規>
 - 4.2 末梢血幹細胞採取 <改訂>
 - 4.3 CD34 陽性細胞数の測定 <改訂>
 - 4.4 コロニーアッセイ法 <改訂>
 - 4.5 リンパ球採取 <新規>
 - 4.6 顆粒球採取 <改訂>
 - 4.7 体外フォトフェレーシス <新規>
- 5 細胞処理
 - 5.1 細胞処理の基本 <改訂>
 - 5.2 細胞処理の基本的操作 <改訂>
 - 5.3 骨髄液の処理(プロセッシング) <改訂>
 - 5.4 末梢血幹細胞の凍結保存 <改訂>
 - 5.5 骨髄・幹細胞・その他製剤の解凍 <改訂>
 - 5.6 幹細胞輸注および合併症 <新規>
- 6 電子カルテあるいは部門システムによる
血液細胞製剤の管理 <新規>

第1章 本テキストの目的

本テキストの目的は、造血幹細胞移植に用いる細胞と、キメラ抗原受容体T(CAR-T)細胞療法などの免疫細胞療法の原料細胞や製品の取扱いを主な対象として、それらの細胞の適切で標準的な調製手順を、本邦の多くの医療機関の経験をもとに集約し、品質マネジメントシステム(QMS)の概念のもとに、提示・解説することである。

本邦では、造血幹細胞移植が各地で実施されるようになったものの、当初、各施設での症例数は年間10例にも満たないところが大半を占めていた。造血幹細胞移植では、骨髄からの赤血球・血漿除去、単核球分離や凍結保存、末梢血への造血幹細胞の動員、成分採血、コロニーアッセイやフローサイトメトリーによる造血幹細胞数測定などの技術が欠かせない。しかし、当初は、造血幹細胞移植を多数実施している施設で移植手技を習得した血液内科医や小児科医が各自の施設に持ち帰り、独自に造血幹細胞移植実施体制を構築していった。このため、造血幹細胞の処理に係わる標準的なテキストは存在せず、施設ごとに独自のマニュアルを用いて治療に用いる細胞の調製を行っていた。一方、日本輸血・細胞治療学会は、これらの細胞の採取、処理、管理、投与が適正に行われることの指導監督を使命の1つとしており、同学会の細胞治療委員会は、第60回日本輸血・細胞治療学会学術総会(2012年5月)から、毎年 of 学術総会で細胞の採取・処理等に係るテクニカルセミナーを開始した。第1回のテクニカルセミナー参加者に「造血細胞の処理・操作・アッセイのためのテキスト ver.1.0」を作成・配布したところ大変好評であったので、その内容を充実させ、2015年に新たに「造血幹細胞移植のための細胞取り扱いに関するテキスト(初版)」を発行した。

以来、これまで本テキストの改訂は行われなかったが、約10年が経過するうちに、間葉系幹細胞やCAR-T細胞等の再生医療等製品が国内で市販され、QMSの概念が浸透してきた。そこで、これらの再生医療等製品、並びに慢性GVHD治療としてのフォトフェレーシス等も含めた現場での運用に役立つ手順の更新が必要となった。対象とする技術や検査方法を各章としてまとめ、実際に運用している施設の手順書や工程記録等も含まれており、そのまま各医療機関で利用しやすいよう工夫されている。

執筆者は、日本輸血・細胞治療学会の細胞治療委員会および関連する委員会委員で、これらの細胞療法に造詣の深い方々である。

本テキストが、各施設での細胞治療成績の向上に貢献することを大いに期待している。

(執筆者: 田野崎隆二、長村登紀子)

第2章 基本となる Quality Management System (QMS) の考え方

はじめに

従来、医療機関における血液細胞採取/処理においては、共通作業手順書や記録の作成により、実施した技術的業務の正当性を保証してきた施設が多かったが、2019年に国内初の市販 CAR-T 製剤が上市され、CAR-T 製剤の原材料となる自己リンパ球採取を担うことになった医療機関の細胞採取/処理部門は、医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令(GMP 省令)、再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令(GCTP 省令)や、欧米で用いられている Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy and the Joint Accreditation Committee - ISCT and EBMT (FACT-JACIE)の基準等に基づいた製薬会社の施設監査を受審することになり、新たなステージに立った(図1)。上記基準では、技術的な内容を保証する作業手順書や記録の作成の他に、継続的な改善活動を行う QMS に基づいた組織運営が要求されている。QMS は品質保証という理念をもとに、提供する製品やサービスに対する信頼性を担保するものであり、様々な国内、国際規格に取り込まれている。臨床検査領域においては、ISO15189(臨床検査室を運営する国際規格)の普及も著しい。本章では、病院内で血液細胞の採取/処理を担う部門における QMS 構築の参考となるよう、QMS の基本的な考え方について記載する。

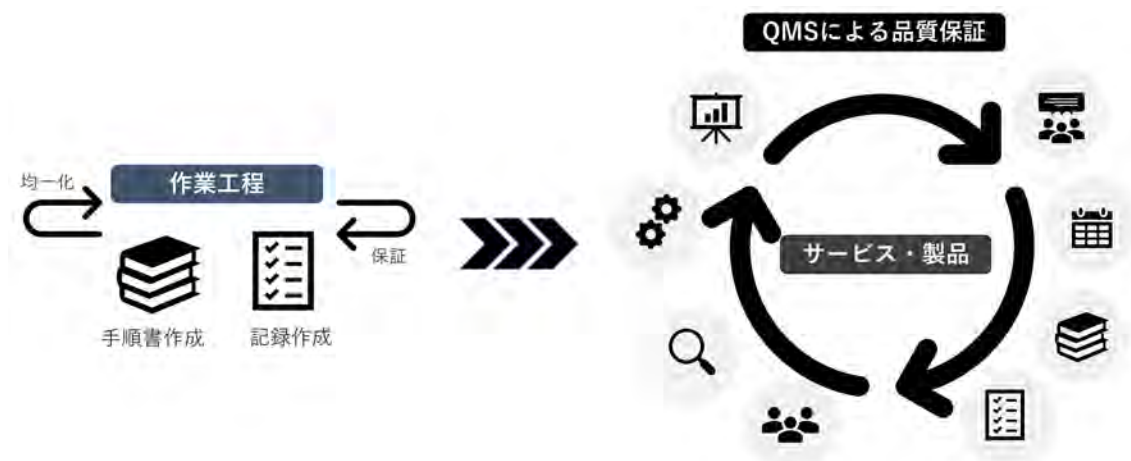


図1 作業の管理から、品質管理システムによる品質保証へのレベルアップ

細胞採取/処理部門における QMS の捉え方

一般的に QMS は「会社・組織が顧客に提供する製品やサービスの品質を継続的に改善していく仕組み」というように説明されることが多い。製造業やサービス業といった業種であれば、製品・サービス・顧客という用語に対しイメージが付きやすいが、医療機関の一部

である細胞採取/処理部門がどのように QMS のイメージを具体化するかが重要である。血液細胞処理における QMS の目的は「血液細胞処理にかかる品質を向上させ、顧客が満足できるサービスを提供するためのマネジメントシステム」と考えられる。QMS を構築する際は、各用語を目的に応じて具体的に理解/定義することが必要である。

＜解釈の一例＞

会社・組織＝細胞採取/処理部門

顧客＝患者、(部門が別であれば)依頼診療科、(CAR-T であれば)製薬会社

製品やサービス＝細胞採取、処理、保管管理、採取産物、細胞製品

QMS 構築までの考え方

細胞採取/処理部門の QMS 構築までの道筋の一例を下記に示す。

①適応範囲を決める

構築しようとする QMS の対象となる範囲を決める。細胞製品を取り扱う医療機関の業務は、細胞採取、細胞処理、保管管理、製品投与等のプロセスに分けることができる。最初に対象製品(末梢血幹細胞、骨髄、自己リンパ球、CAR-T 製品等)や、対象とする業務の範囲を決めておくことが重要である。融解や輸注を管理範囲とするか否かは、外部からの要求事項もふまえ、決定する(図2)。



図2 品質保証の対象範囲例

②組織/責任体制を明確化する

対象とする業務、製品を決めた後、組織管理体制を規定する。施設ごとの組織背景に合わせた管理体制の構築が重要である(図3)。また、QMS はトップマネジメントの考え方をもとにしていることから、責任者の任命は必須である。

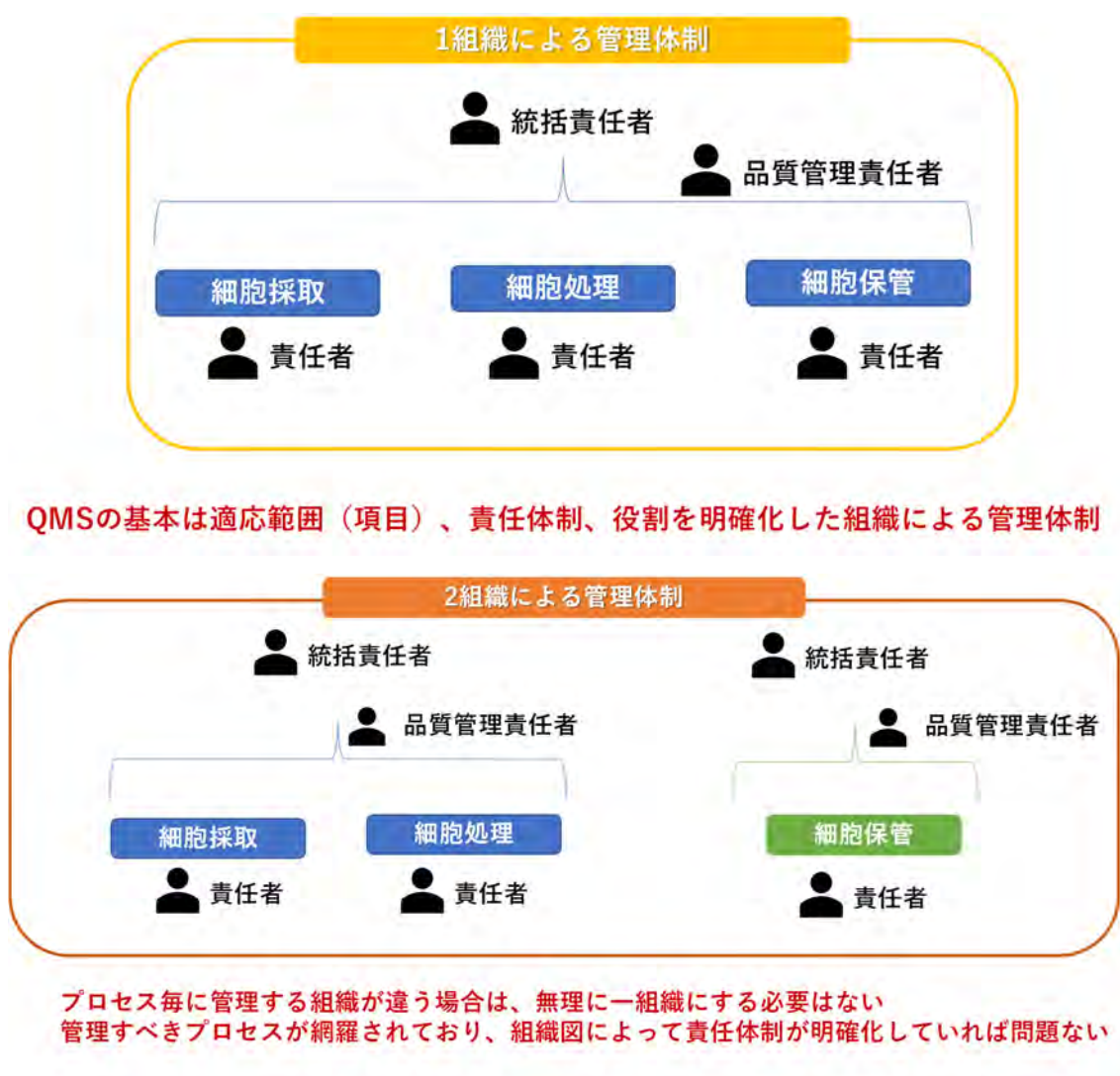


図3 組織管理体制の例

③品質方針を決める

QMS の根幹は品質方針を決めることである。品質方針は、会社/組織の理念であり、責任者による組織運営の意向を取り入れた内容とする。

④継続的に改善していく仕組みを考える

QMS とは「継続的な改善の仕組み」であり「PDCA サイクルを回す」ことであると説明されることが多いが、具体的に何をすればよいか、考えに難航するケースは少なくない。「何をすればよいのか」「どのような点を管理しなければならないのか」「どのような仕組みにすればよいのか」について、考え方やアプローチの方法は様々だが、参考として2つのステップでの考え方を示す。

(1) 関連する規格の要求事項から考える

QMSの構築は、製品やサービスの品質を屋根として、保証するための支柱を立てていくイメージである。PDCA サイクルを回すのは、支柱を常に磨き上げる作業であり、最初にどのような柱が必要か、設計図を知ることが必要であるため、QMS に関連する規格等を知る必要がある。QMS に関する代表的な国際規格として ISO9001 が広く知られている。臨床検査室で浸透している ISO15189 のマネジメントの要求事項も ISO9001 と互換性がとれた形式となっている。また、GCTP 省令の条項も、製品品質を保証するための要件が記載されている。参考にする資料によって章立て、用語は異なるが、指示している内容に大きな差はない(表1)。

本則 第一条（趣旨） 第二条（定義） 第三条（適用の範囲） 第四条（品質リスクマネジメント） 第五条（製造部門及び品質部門） 第六条（製造管理者） 第七条（職員） 第八条（製品標準書） 第九条（手順書等） 第十条（構造設備） 第十一条（製造管理） 第十二条（品質管理） 第十三条（製造所からの出荷の管理） 第十四条（バリデーション又はベリフィケーション） 第十五条（製品の品質の照査） 第十六条（変更の管理） 第十七条（逸脱の管理） 第十八条（品質等に関する情報及び品質不良等の処理） 第十九条（回収処理） 第二十条（自己点検） 第二十一条（教育訓練） 第二十二条（文書及び記録の管理） 第二十三条（記録の保管の特例）	4. マネジメント要求事項 4.1 組織及び管理主体責務 4.2 品質マネジメントシステム 4.3 文書管理 4.4 サービスの合意事項 4.5 委託検査室による検査 4.6 外部からのサービス及び供給品 4.7 アドバイスサービス 4.8 苦情処理 4.9 不適合の識別及び管理 4.10 是正処置 4.11 予防処置 4.12 継続的改善 4.13 記録の管理 4.14 評価及び監査 4.15 マネジメントレビュー
--	--

表1 要求事項の実例

(2) 組織背景、目的に応じて具体化していく

QMS の要求事項は普遍的な記載となっているため、目的とする製品、サービスに応じて具体化していく必要がある(支柱をアレンジ、内装を装飾していくイメージ)。実際に、品質保証に対するリスクを様々な視点から考え、挙げたリスクをどのように排除、管理していくか考える際は、どの視点で考えるかが重要であり、少なくとも作業者、資材/環境、運用システムの 3 方向からのアプローチは必要である。QMS の構成イメージを図4に示す。また、外部監査や施設認証を前提とした場合は、業界で常識と位置付けられている内容や具体的に提示される要求事項は遵守しなければならない。PDCA サイクルを回していくにあたっては、自施設の組織背景や環境に合わせ、実現可能な取り組みとすることが、継続させるために重要である(図5、図6)。

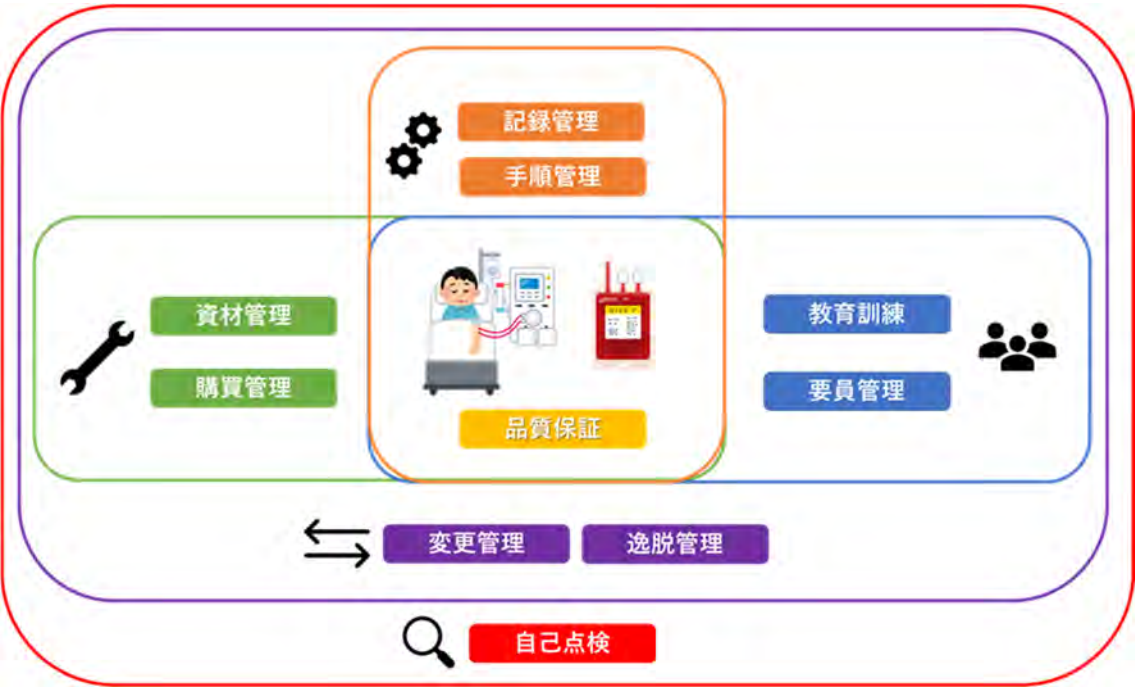


図4 QMSの構成イメージ

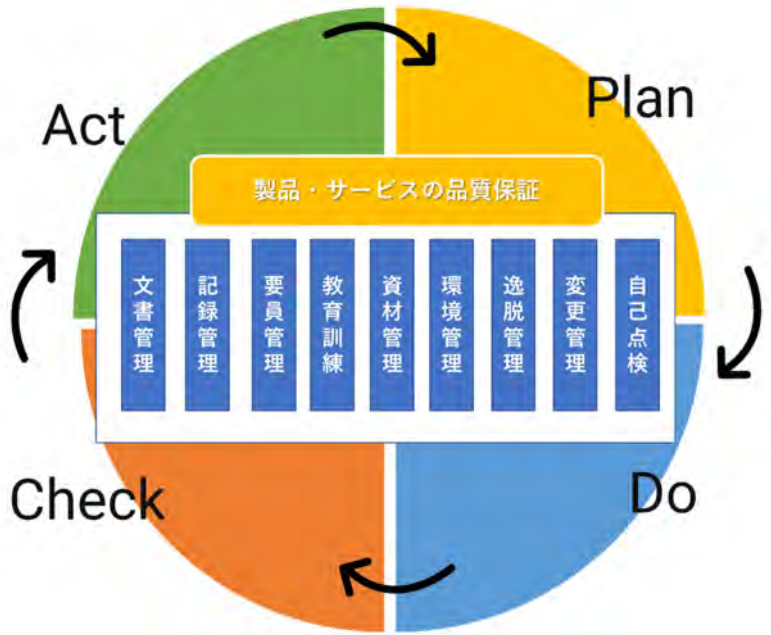


図5 PDCA サイクルに基づく品質改善

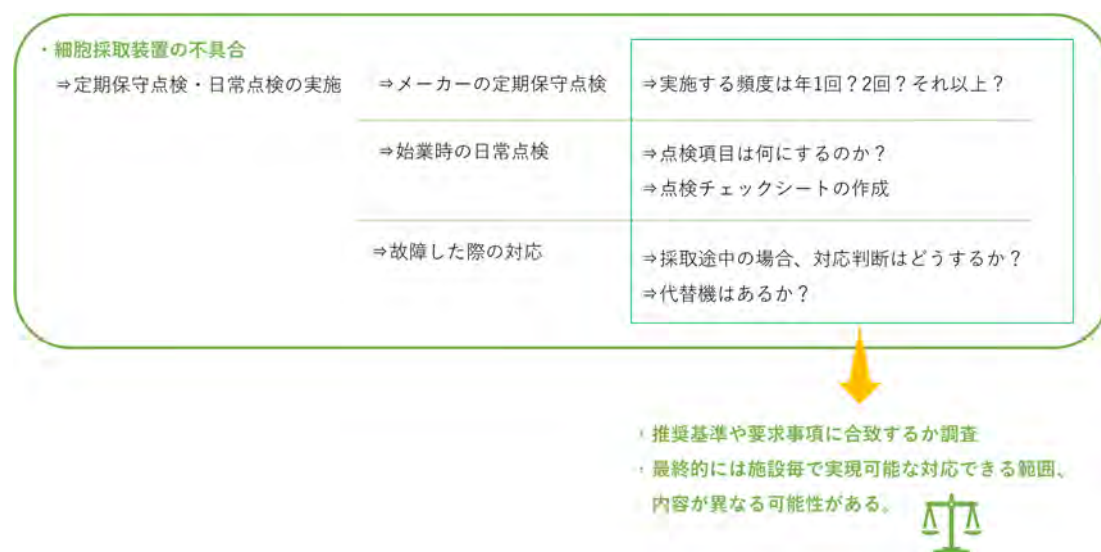


図6 具体的な検討課題の1例

①構築したQMSを文書化する

構築したQMSは文書化することで、組織内の共通認識を得られると共に、外部機関や第三者に対し説明可能となり、理解、評価を受けられる。QMSの文書は、上位から、理念、規約、手順、記録のような階層式で管理することが多い。

なお、階層の数は管理方法により異なる(図7)。参考までに、兵庫医科大学病院及び東北大学病院での文書の一部を提示する(資料1、資料2、資料3)

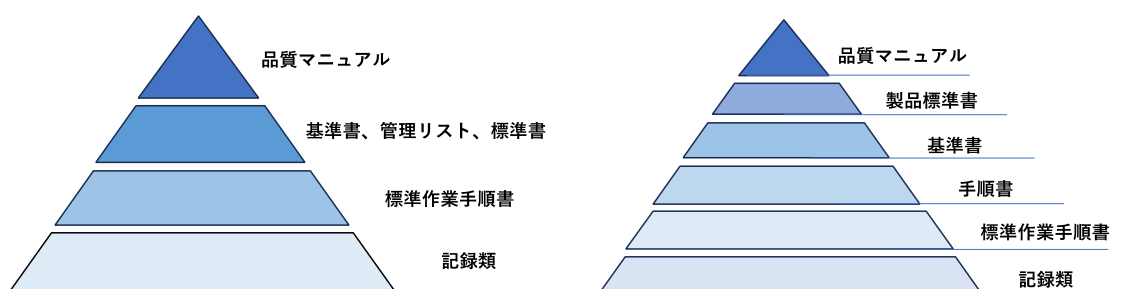


図7 文書体系例

②リスク管理の手法を組み込む

いかに強固なQMSを構築したとしても、医療の現場では予期せぬ不具合が発生する場合がある。不具合発生時にも予定している血液細胞処理を継続させるために、予め予想されるリスクや影響を見積り、対策を講じることで、問題が発生した場合の影響を最小化する必要がある。不具合は単独では起こらず、いくつものイベントが重なり起こるとされており、そこには不具合が起こるシステム(構造)がある。そのため、リスクアセスメントを行い、リスク特定・リスク分析およびリスク評価を実施

し、構造の不備を反復的に見直す仕組みや、リスクが発生した際、誰が意思決定を下すのかを明確にし、スピーディーに対処できる体制の整備を行なう。具体的には現状を把握し、評価（リスクの特定・分析）を行い、改善計画や継続計画を策定し計画を実施後、有効性を評価する。組織における評価と改善活動のプロセスを図8に示す。

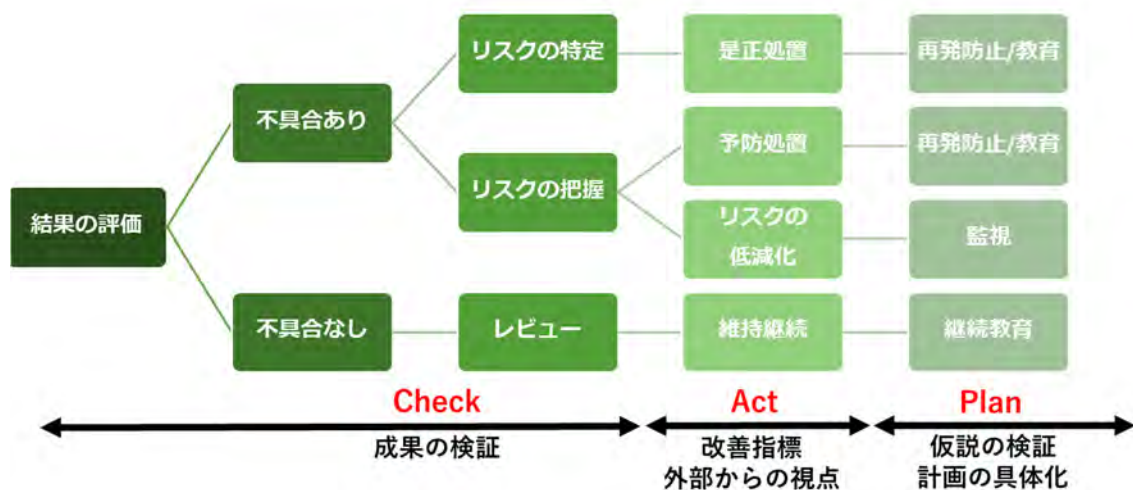


図8 組織における評価と改善活動のプロセス

日本骨髄バンクからの医師宛通知文【調整医師・採取医師向け】等を活用し、他施設のトラブル事例が自施設でもリスクになり得るか検証する事も有用である。

また、自施設で不具合が発生した際に、不具合を起こしたスタッフを処罰することは、再発防止の手がかりを隠蔽することとなり、リスク改善には繋がらない。ハインリッヒの法則を考慮し、小さいリスクやヒヤリ・ハット事例を積極的に減らし、スタッフ全体の底上げを行うことが、安全文化の構築につながる。

さいごに

QMS は、製品やサービスの品質を保証するためのツールであり、概念である。目的や組織背景により QMS の構造は変化するため、「正解」というような具体的な内容を細部まで記載することは難しい。本章では QMS の根幹である「組織管理体制の明確化」「管理システムの持続性」「リスク管理」といった要素について触れたが、QMS 構築へのアプローチの1つとして参考にして頂きたい。

QMS においては、関係法規や要求事項を満たし、自施設/組織に適合し、持続可能で、外部に自信を持って提示できる、より良い方法を考え活動し続けることが何より重要である。QMS を動かし続けるのは人であり、私たち細胞採取/処理に関わる従事者は、QMS という概念に精通した人材育成を行い、実践しながらより深く理解し、研鑽を継続する必要がある。

CAR-Tを契機に、病院における細胞採取/処理部門にQMSの概念が入ってきたことを、国際的に誇れる品質水準に飛躍するチャンスと捉え、今後の広がりを期待したい。

参考文献

- 1) テキストブック 再生医療～創る、行う、支える～ 日本再生医療学会監修
- 2) 厚生労働省 品質リスクマネジメントに関するガイドライン
<https://www.pmda.go.jp/files/000155974.pdf>
- 3) JAMT 技術教本シリーズ 臨床検査技師のための医療安全管理教本 日本臨床衛生検査技師会監修

（執筆者：藤原実名美、池本純子、岩木啓太、査読者：新井康之）

資料2 様式一覧または項目名一覧(兵庫医科大学病院)

内部文書リスト(細胞治療関連)

LI4.3-細胞治療

文書番号	文書名	版番号	最新版使用開始日
QM001	品質マニュアル	8	2023/6/1
QM002	QMS年間計画	2	2022/7/1
リスト(LI)			
LI4.3-細胞治療	内部文書リスト(細胞治療関連)		2023/7/1
LI4.3-細胞治療	内部文書リスト(細胞治療関連ラベル)		2023/4/1
LI4.13-細胞治療	記録管理リスト(細胞治療関連)		2023/7/1
標準操作手順書(SOP)			
SOP-TCT-A001	アフエーシスに関わる共通作業手順書	8	2023/2/15
SOP-TCT-A002	輸血部看護手順書	10	2023/4/1
SOP-TCT-A004	末梢血幹細胞採取手順書	6	2023/2/15
SOP-TCT-A005	顆粒球採取手順書	7	2023/2/15
SOP-TCT-A008	移植に関わる検査手順書	5	2023/7/1
SOP-TCT-A009	データ入力に関する手順書	3	2021/9/24
SOP-TCT-B001	細胞治療向け製品管理手順書	5	2023/1/15
SOP-TCT-B002	製剤室清掃手順書	5	2023/2/1
SOP-TCT-B003	製剤室及び細胞保管室入退室管理手順書	5	2023/2/15
SOP-TCT-B004	検証又は確認に関する手順書	3	2022/9/1
SOP-TCT-B005	品質の照査に関する手順書	3	2022/9/1
SOP-TCT-B006	逸脱の管理に関する手順書	5	2023/2/15
SOP-TCT-B007	臍帯血処理手順書	5	2022/7/15
SOP-TCT-B008	骨髓液処理手順書	6	2022/7/15
SOP-TCT-B009	末梢血幹細胞凍結・解凍手順書	6	2022/11/15
SOP-TCT-B010	構造設備及び設置機器の管理に関する手順書	10	2023/7/1
SOP-TCT-B021	プログラムフリーザー使用手順書	4	2022/6/1
SOP-TCT-B022	製剤室環境試験手順書	4	2023/2/15
SOP-TCT-B024	液体窒素管理手順書	5	2023/2/15
SOP-TCT-B025	アフエーシス産物の梱包・発送手順書	6	2023/2/15
簡易マニュアル(EM)			
EM-TCT-B003	製剤室入室時更衣手順	1	2019/7/1
EM-TCT-B010-1	液体窒素容器アラーム発生時の対応	1	2021/4/20
EM-TCT-B023	安全キャビネット取扱い方法	1	2019/10/1

兵庫医科大学病院 輸血・細胞治療センター

資料3 文書例 指図書 兼 記録書(一部)(東北大学病院)

自己リンパ球凍結保存処理
作業工程記録

東北大学病院 輸血・細胞治療部

記録番号：DC-1

2020年7月27日作成 第5版

採取年月日	2020/7/29
氏名	東北次郎
氏名(英字)	Jiro Tohoku
院内ID	30-0000-3
生年月日	1958/1/1
性別	M

Apheresis ID	97101234
Subject ID	/
凍結BagID 1	99-0200-1234
凍結BagID 2	99-0200-5678
凍結BagID 3	
凍結BagID 4	

調製作業者1: _____

調製作業者2: _____

項目	手順	記録
アフエーシ ス産物の前 処理	☐ バイアル3本に、患者氏名・患者ID・A-ID (Apheresis-ID)を印字したラベルを貼付する。	
	☐ 採取バッグの中で細胞懸濁液をゆっくりとよく混和する。	
	☐ サンプルバルブを利用し、細胞液を1.1ml分取する。	
	☐ バイアル3本に分注する。(500μl×2本、100μl×1本)	
	☐ 採取バッグ中央部のラインを約10cm残し、他のラインはシーリング後に切り取る。	
	☐ 採取バッグの重量を計る。	g
	☐ 細胞液量を計算する。	
	(g - 40g(採取バッグ風袋)) / 1.04 = ml	-38 ml
	☐ 採取バッグを搬送用保冷ボックスに収納する。	
	☐ 検査用サンプルを検査部門及び輸血部門へ移送する。	
ラベル発行と CPCへ搬送	☐ 検査部門より血算の検査結果を受け取る。	
	☐ 検査結果を「細胞濃度計算フォーム」に入力し、遠心or希釈の有無・凍結バッグ数を決定する。	
	☐ 決定した凍結バッグ数のラベルをBLADより発行する	
	☐ QCバイアル用ラベルを発行する。	
	(A-ID (Apheresis-ID)、date(採取日)、Name(英字氏名)を耐冷用テプラに印字)	
	☐ ラベルに記載された患者情報が、正確な患者情報と一致することを確認する。	
	<凍結バッグラベル記載内容確認> <QCバイアルラベル記載内容確認>	
	確認者1: _____ 確認者2: _____	
	患者の識別情報 □一致する □一致しない	
	患者の識別情報 □一致する □一致しない	
備品の準備	☐ 運搬用フリーザーバッグで細胞調製担当者がCPCへ運搬する。	
	☐ 無菌接合装置を細胞調製室4の排気フィルターの前に設置する	
	☐ 量りと分離スタンドを設置する	
	☐ シューキングミキサーとシリンジポンプを設置する。	
	☐ ハンドシーラーの充電状況を確認し、必要であれば充電する。	
凍結保存処 理の開始	☐ 調製開始日時を記録する。	年 月 日
	(診療支援端末の時間をCPC管理室に電話で聞く)	:
	☐ 採取バッグの重量を計る。	g
	☐ 前処理段階の液量との相違を確認する。	± g

第3章 骨髄採取

はじめに

造血幹細胞移植は既に半世紀の歴史を持つが、最初期から実施されているのが骨髄移植である。骨髄採取法はトーマスの原法¹⁾に基づく方法が改変された形で行われている。

本邦では、同種骨髄移植のための骨髄採取術について、日本造血・免疫細胞療法学会から「造血細胞移植ガイドライン-造血幹細胞採取(第2版)」²⁾が発行されている。これは、それまで健常ドナーからの骨髄採取に限定したガイドラインが存在しない中、日本造血細胞移植学会(現・日本造血・免疫細胞療法学会)、日本輸血・細胞治療学会、日本小児血液がん学会の三団体合同の造血幹細胞採取ガイドライン策定にあたり、同種骨髄採取の項を設ける必要性が認識され2021年に第1版が発行されたものである。また、日本骨髄バンクでの非血縁ドナーの骨髄採取においては、日本骨髄バンクの「ドナー適格性判定基準」³⁾「骨髄採取マニュアル」⁴⁾を遵守する必要がある。採取術の詳細についてはこれらの文書を参照いただき、本項では、主に細胞製剤としての取り扱いに焦点を当てて解説する。

なお、国際的にはFACT-JACIE⁵⁾がスタンダードである。移植施設がセンター化されていない国内では患者の利便性は高いが、細胞製剤としてのグローバルスタンダードの質を満たすのは困難な状況である。しかし、細胞製剤が国際間を行き来する現在、国際標準の概要を知り、可能な限り取り入れていく努力を怠ると、日本の医療の信用が失われることも危惧される。

骨髄採取の特徴

最も大きな特徴は、その細胞採取の主な工程が、手術室内で、普段細胞製剤を取り扱うことのない臨床医のみで実施されることが多い点である。しかも、移植ソースとして最も古いため、取り扱いを熟知していると誤認されていることも少なくない。しかし実際には、様々な過誤の事例が骨髄バンクホームページ上の安全情報データベースに公表されている(https://www.jmdp.or.jp/donor_safety/)。このため、骨髄採取においても血液細胞処理担当部門のバックアップが強く推奨される。

骨髄採取は血縁者間と非血縁者間の二種類に分けられる。手技は同一であるが、後者は日本骨髄バンクを介し、種々の手続きや製剤の取り扱いが異なることに留意する。ドナーは匿名のボランティアで、人の手で時に長距離運搬され、別の施設で使用される細胞製剤なのである。

採取ボリュームが多いことから、あらかじめ自己血採血が必要となり、細胞採取はこの時点から始まることも忘れてはならない。

自己血採血

採血手技については、術前患者に対して実施される貯血式自己血採血⁶⁾と同様である。一方、手術中の出血量に応じて返血する患者とは異なり、あらかじめ出血量がほぼ決まっている点、速やかな社会復帰のため術後の貧血状態を許容しない健常者に対して実施される点、同種血輸血は可能な限り避けなければならない点が大きく異なる。エリスロポエチンも使用しない。したがって、準備した自己血が骨髄採取時に使用できない場合は予定の骨髄採取の延期もしくは中止、採取量を減らす、といった対処が必要となるため、患者にも大きな影響を及ぼすことになる。

貯血量は、出血量、すなわち、採取予定量に応じて決定される。計算方法、および手技等は「骨髄採取マニュアル」⁴⁾に詳説されている。血縁ドナーについても「造血細胞移植ガイドライン-造血幹細胞採取」²⁾にて「骨髄採取マニュアル」⁴⁾を参照するよう記載されている。

製剤管理も「骨髄採取マニュアル」⁴⁾に従う。日本骨髄バンクでは自己血が使用不可となった事例として、保冷库温度調節器内センサーおよび警報システムの故障や不適切な管理で保管中の温度が上昇した事例^{7,8)}、寒冷凝集素によると考えられる凝集が採取前日に判明した事例⁹⁾、有効期限の計算が不適切で期限を超えた事例¹⁰⁾が報告されている。さらに、採取中に返血すべき自己血が返血されず、病棟に搬出されて不適切に管理された事例も報告されている¹¹⁾。輸血部門における管理の徹底のみならず、手術室や病棟など関連部署への確認も忘れてはならない。

骨髄採取術

健常人に対して全身麻酔下で、侵襲的な方法により実施される。採取後にも健康上の問題を来さないよう、最大限の安全が求められるため、「骨髄採取マニュアル」⁴⁾「造血細胞移植ガイドライン-造血幹細胞採取(第2版)」²⁾に基づき、麻酔科専門医の麻酔管理(指導)のもと、採取を実施する。

日本骨髄バンクにおける採取細胞数の目標は、患者体重 1kg あたりの有核細胞数 3.0×10^8 以上である。採取ボリュームの目安は 10～15mL/kg 患者体重であるが、「骨髄採取マニュアル」⁴⁾で、ドナーの体格、ヘモグロビン値、自己血貯血総量から設定される採取上限まで採取可能である。目標細胞数を得るため、採取の途中で細胞数をカウントし採取量を再検討することが求められる¹²⁾。

抗凝固剤はヘパリンを使用し、最終濃度 10 単位/mL 前後とすることが推奨されている。手術時の確認不足が原因で、ヘパリンが過少となった事例が報告されており¹³⁾⁻¹⁵⁾、薬剤の使用管理のみならず、払い出す際の外観確認で凝集塊の有無をチェックすることも忘れてはならない。なお、ヘパリンが過多になっても、移植施設で予定していなかった洗浄が必要になったり、未処理で輸注すると患者に出血症状を来す恐れがある。採取の都合上多く使用せざるを得なかった場合は移植施設に注意喚起を申し送る等の配慮が望ましい。

採取された骨髄液は、引き続き手術室内で、フィルターによる骨片除去、検査検体のサ

ンプリング、骨髄バッグへの充填と密封などの処理が必要となる。骨髄バッグの不具合等が複数報告されている^{16)~20)}。手技に熟練し異常時の素早い対応が求められるのは言うまでも無いが、複数の業種のスタッフで確認するなど、管理体制の構築が求められる。

骨髄運搬中の骨髄バッグの破損が報告されている⁴⁾。特に非血縁者間移植の場合、骨髄液は可能な限り複数のバッグに分割することが推奨されている。分割は、手術室内で実施しても、いったんひとつのバッグに充填し細胞治療部門等に払い出してから同部門で分割しても良いが、後述する細胞数サンプリングのタイミングも含め、予めマニュアルを作成しておく必要がある。

骨髄バッグの封印は、チューブシーラーによるヒートシーリングを必ず実施する。近年は、シーリングされていない骨髄バッグを受け取ることは少ないものの存在し(筆者(原口)自験例では2020年6月-2023年6月の175件中4件)、シーリング失敗も報告されている²¹⁾²²⁾。チューブシーラーはチューブを溶着して密封するため、中途半端なシーリングはかえってチューブを破損する。推奨通り2点シールを実施してもバッグに近いシーリングを失敗すれば、もう一方が確実にシールされていても漏出する(図1)。細胞治療部門は日常的に使用しているため操作に習熟し危険性も熟知しているので、不慣れな臨床医のみで手術室に入る場合は使用方法を十分に指導する。なお、移植施設でチューブを用いて無菌サンプリングしたり、無菌接合装置でチューブ接合して骨髄処理等をする場合があるため、短すぎる位置でシールしない。日本骨髄バンクでは、6cm以上離れた場所で留めることが望ましいとされる²³⁾。確実な密閉のため、シールの内側で結び目やクランプで補強することも推奨されるが、同様に、短すぎる位置での不可逆的な密閉(ほどけない結び目等)は避け、さらに離れた位置でシーリングする。



図1 シーリング不正例(自験例)

細胞数カウントの方法

非血縁者間移植の場合、骨髄採取施設と移植施設が異なるため、細胞数カウントに施設間差があつてはならない。しかし実際には、有核細胞数の最大3倍にもなる施設間差が報告されている²⁴⁾。日本骨髄バンクが実施した採取施設における現状調査²⁵⁾では、9割以上で採取施設が精確な値を確認すべきだと考えており、採取時に精確に測定する必要がある。

差が生じる原因として、測定値が正しくない他に、サンプリングが不適切、採取量が不適切であることも考えられる。採取量については、記載の採取量と実測した重量を比較した筆者の自験では、最大307mL、率にして22%の差であり、細胞数自体の施設間差としては大きく寄与しない(図2)。

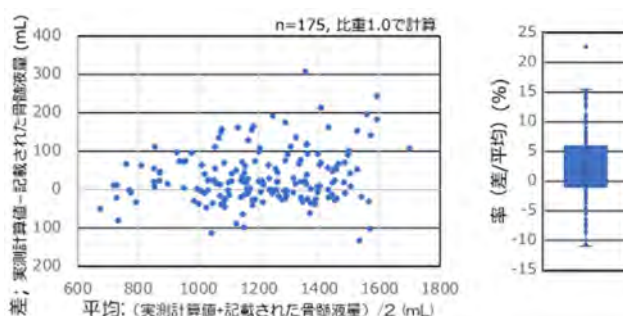


図2 受け取った骨髓液量実測値と記載された値の分析(自験例)

一方、測定値については、現在認可されている自動血球分析装置は、いずれも骨髓液の測定が想定されていない。末梢血白血球数として表示される数字は通常有核赤血球を除いた値である。骨髓内の脂肪滴が機械上白血球として認識されてしまう場合がある。また、測定原理によっては、白血球分画を大きさで判断するため、一部の有核赤血球が排除される場合もある(図3)。これらを考慮し、機器に応じて最も骨髓有核細胞数を測定するのに適した測定モードで測定する必要がある^{26, 27)}。

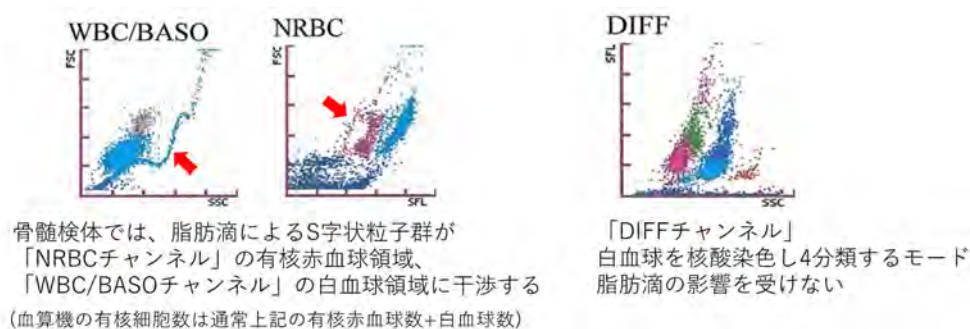


図3 Sysmex XE-2100 で骨髓液を測定した例

不適切なサンプリングは、最も大きな誤差が生じうるが、確実に防ぐことができる。時間的・心理的余裕が少ない手術室内で、手技にも慣れていない臨床医が実施することが多いため、複数バッグにおけるサンプリング方法を含め、マニュアル化などで確実に正しく実施できるような運用が必要と考えられる。「骨髓採取マニュアル」⁴⁾には、【移植骨髓液の有核細胞数測定に関する提言】²⁵⁾として上述の注意点のまとめを掲載している(表1)。

検体採取

- 骨髄採取時における骨髄有核細胞濃度は継時的に変化し、フィルターを通過させることでも変わることから、移植骨髄液全体を正しく反映できる検体を採取する
例 1.ひとつのバッグに集めた骨髄最終産物から（バッグ分割前に）検体を採取する
例 2.すべての骨髄最終産物バッグからそれぞれに検体を採取する
- 検体はバッグ全体を十分攪拌し、確実に均一化した上で採取する
※液全体を十分に攪拌できない状態での検体採取はしない
- バッグ内が清潔に保たれるよう留意する

測定法

- 測定直前に検体を充分攪拌し均一化する
- 自動血球分析装置は、骨髄検体を測定する仕様ではないことに留意する
- 自動血球分析装置を使用する場合は、メーカー・機種により異なるため、担当者に相談し、最も適切なモードでの測定を検討しなければならない
- 一部の有核赤血球が除外されるため、測定原理が電気抵抗法のみのも機器の使用は避ける
- 自動血球分析装置を使用する場合は、あらかじめ血球計算盤を使用した目視算定結果との一致を確認しておく
- 目視算定する場合は、検査者間誤差の無いように「目合わせ」をしておく

管理

- 標準作業手順書を作成しておく
- 手順書に基づいて測定し、報告した記録文書を作成する
- 機器保守管理、試薬管理、精度管理を実施し、管理台帳を作成する
- 文書・記録は適正に管理保管する

表 1 移植骨髄液の有核細胞数測定に関する提言

（日本骨髄バンク：骨髄採取マニュアル ホームページ版（2024.10.18 改訂） p13

https://www.jmdp.or.jp/pdf/medical/physicians/manual/Bone_marrow_collection_manual.pdf)

ラベリング

細胞製剤を安全に取り扱うために極めて重要とされている。このため剥がれたり消えたりしない素材を採用する必要がある²⁸⁾。国際規格 ISBT 128 が 80 を超える国で採用されており、この採用により細胞治療製品の品質、安全性、トレーサビリティが大幅に向上すると考えられている²⁹⁾。しかし、本邦の院内細胞治療製剤では ISBT 128 は一般的ではない。このためラベル形式については各施設で骨髄採取責任者が承認したテンプレートを準備することとなる。以下の情報を含む必要がある。日本骨髄バンクでは、専用のラベルを使用する。ドナーの個人情報を記載してはならない(図 4)。

- ・ 識別番号
- ・ 製剤名（骨髄）
- ・ （必要に応じて）患者名
- ・ （必要に応じて）ドナー名
- ・ 採取年月日

図4 ラベルに含めるべき情報と、骨髄バンクの専用ラベル

部門システムで必要な患者・ドナー情報を組み込んだラベルが出力できると良い。

ラベルは骨髄バッグごとに取り換えの無いように運用し、採取後速やかに貼付する（採取前は清潔操作のため貼付できない）。貼付の際は、ラベル情報が間違っていないか2人以上で確認する必要がある。

ラベリングの重要性について臨床医を含む多くのスタッフが認識する機会は乏しい。移植施設に送るための骨髄バッグラベルとして必要な情報が記載されず、ドナーの個人情報のみが記載された事例が報告されている³⁰⁾。ドナー匿名性保護を含む造血幹細胞採取についての教育を関係者全員に定期的実施するにも限界がある。ラベリングの重要性を認識した細胞治療部門のスタッフや部門システムの介在が求められる。

骨髄採取物の保管・出庫

骨髄採取後、非血縁者間移植の場合は他施設に払い出し、院内使用の場合は細胞処理部門においての細胞処理や病棟への出庫となる。骨髄処理が不要な血縁者間移植の場合であっても前投薬や患者モニタリングの準備等で、非血縁者間の場合は搬送者の未着等で、短時間の保管が必要であるし、患者の治療の都合によっては数時間の保管が必要になる場合もあるが、病棟等で放置することがあってはならない。このためにも、細胞治療部門で骨髄製剤化の手続きをとり、輸血製剤と同様にシステム運用することが望ましい。出庫時の記録も残すことができる。臨床医は、細胞製剤を出庫するという概念を身につける機会に乏しい。細胞治療部門の積極的な介在や教育が必要であろう。

骨髄採取物の外観は血液と変わらないため、1L 前後の血液の詰まったバッグを搬送することになる。適切な容器に入れて運搬する必要がある。

非血縁者間移植細胞の取り扱いには、第三者の手で列車や航空機等の公共交通機関を利用し、時に長時間かけて運搬され、採取施設と異なる施設で使用されることに特に配慮する。バッグ破損時の漏洩に備えてさらに袋に入れ、衝撃、圧力変化、温度変化等に耐えられる素材で作られた外部容器に格納する。

払い出し時には再度バッグのシーリングが確実にされていることを確認する。また、シーリ

ング箇所では、シーリング箇所では切断していない骨髄が届く頻度が多い(171件中105件:図5)。シーリング箇所の外側は確実な密閉がなされていない。特に、フレゼニウス社の骨髄バッグは先端が密閉しないため、チューブ内の血液が漏出し、バッグ汚染の原因となる。日赤で確実にシーリングされた血液製剤を取り扱う輸血・細胞治療部門のスタッフは、適切なシーリングを施し、シーリング箇所でも適切にチューブを切断することで確実に密閉できること、誤った使い方は非常に危険なことを熟知している。ボランティアドナーが多大なリスクを侵して採取した細胞製剤の取扱いは、そのプロフェッショナルの輸血・細胞治療部門が担うことが極めて望ましい。



図5 断端処理不良例

骨髄バッグの血液汚染も少なくない(167件中75件に明らかな汚染あり)。バッグラベルが汚染していればラベル情報の視認に問題を来し、汚染が酷い場合は骨髄液の漏出すなわち骨髄液の清潔性までも疑われる事態となる。そして何より、必ずしも医療系の資格を持たない搬送者を危険にさらすことになる。血液汚染した手で手術室からそのまま払い出すことによる危険、シーリング箇所でも切断しないことで骨髄液を漏出させるかもしれない危険を認識する必要がある。

非血縁者間移植で搬送業者に依頼することも多くなった。この場合、採取施設で責任を持って梱包する必要がある。クレンメなど尖った部分が直接骨髄バッグに当たらないよう、骨髄バッグが飛び出すことのないよう、清潔な場所で慎重に梱包する(図6)。医局など事務室での作業は好ましくない。



図6 適切な梱包例

骨髄バッグの出庫時には日本骨髄バンクの受け渡し記録を用い、出庫日時、受領者名等を記載する。細胞治療部門から払いだすと、製剤を適切な状態で払い出せるだけでなく、部門システムに記録を残すことができるので記録上も望ましい。払い出し時のチェック項目の例を以下に挙げる(表2)。複数名でチェックして払い出す。

払い出し時のチェックリスト例	
☐	重量測定
☐	ヘパリン使用量の確認
☐	外観確認
☐	凝集塊がない
☐	エア混入等による支障はない
☐	その他の異常がない
☐	骨髄バッグの確認
☐	汚染がない
☐	破損や漏出がない
☐	概ね6cm以上のチューブが残してある
☐	適切にシールされ、断端処理がなされている
☐	ラベリング
☐	適切なフォーマットでラベリングされている
☐	(非血縁の場合) ドナー個人情報に含まれない
☐	剥がれたり汚染したりしていない
☐	梱包
☐	適切に梱包されている
☐	(非血縁の場合) ハーベストレポートの準備
☐	(非血縁の場合) 末梢血検体等の準備

表2 払い出し時のチェックリスト例

まとめ

骨髄移植についても、(洗浄や濃縮だけでなく)採取術から細胞製剤を取扱っていることを忘れてはならない。このため、臨床医と細胞治療部門は一層密に連携する必要がある。すべての移植施設で今一度見直していただければ幸いである。

参考文献

- 1) Thomas ED, Storb R. Technique for human marrow grafting. Blood. 1970;36:507-15.
- 2) 一般社団法人日本造血・免疫細胞療法学会. 造血細胞移植ガイドライン-造血幹細胞採取(第2版). 2022年5月
(https://www.jstct.or.jp/uploads/files/guideline/02_03_harvest02.pdf)
- 3) 公益財団法人 日本骨髄バンク. ドナー適格性判定基準 HP版(2024/3/25)
(https://www.jmdp.or.jp/pdf/medical/physicians/qualification/tekikakukijun_20240325.pdf)
- 4) 公益財団法人 日本骨髄バンク ドナー安全委員会. 骨髄採取マニュアル ホームページ版(2024/10/18改訂)
(https://www.jmdp.or.jp/pdf/medical/physicians/manual/Bone_marrow_collection_manual.pdf)
- 5) Eighth Edition FACT-JACIE International Standards for Hematopoietic Cellular Therapy Product Collection, Processing and Administration, Version 8.1.

(<https://fact.navexone.com/content/dotNet/documents/?docid=533&public=true>)

6) 一般社団法人 日本自己血輸血・周術期輸血学会 貯血式自己血輸血実施指針 (2020)

(https://www.jsat.jp/jsat_web/download/pdf/cyoketsushikijikoketsushishin_2020.pdf)

7) 公益財団法人 日本骨髄バンク 医師宛通知文 (2010.3.5). 自己血保冷庫の不具合により、自己血が使用不可で骨髄採取延期となった事例.

(https://www.jmdp.or.jp/documents/file/04_medical/notice_w/2010_03_05.pdf)

8) 公益財団法人 日本骨髄バンク 医師宛通知文 (2016.11.15). 自己血貯血用冷蔵庫内の温度上昇により自己血が使用不能となった事象について【結果報告】.

(https://www.jmdp.or.jp/documents/file/04_medical/notice_w/anzen20161115.pdf)

9) 公益財団法人 日本骨髄バンク 医師宛通知文 (2020.10.5). 自己血が冷蔵状態で凝集があった事例について〈安全情報〉.

(https://www.jmdp.or.jp/documents/file/04_medical/notice_w/2020_10_15.pdf)

10) 公益財団法人 日本骨髄バンク 医師宛通知文 (2010.12.16). 自己血の有効期限について.

(https://www.jmdp.or.jp/documents/file/04_medical/notice_w/2010%2012%2015%2003.pdf)

11) 公益財団法人 日本骨髄バンク 医師宛通知文 (2018.9.14). 自己血の取り扱いについて(通知). (https://www.jmdp.or.jp/documents/file/04_medical/notice_w/2018_09_14_2.pdf)

12) 公益財団法人 日本骨髄バンク 医師宛通知文 (2015.8.14). 骨髄採取時における細胞数の途中カウントについて(お願い)

(https://www.jmdp.or.jp/documents/file/04_medical/notice_f/2015_08_14_2.pdf)

13) 公益財団法人 日本骨髄バンク 医師宛通知文 (2011.10.14). 抗凝固剤、ヘパリン最終濃度について.

(https://www.jmdp.or.jp/documents/file/04_medical/notice_w/2011_10_14.pdf)

14) 公益財団法人 日本骨髄バンク 医師宛通知文 (2023.3.30). 採取骨髄液に混注された抗凝固剤(ヘパリン)が過少だった事例.

(https://www.jmdp.or.jp/documents/file/04_medical/Insufficient_heparin.pdf)

15) 公益財団法人 日本骨髄バンク 医師宛通知文 (2019.8.15)骨髄採取中、骨髄液に抗凝固剤(ヘパリン)が混注されていなかった事例について.

(https://www.jmdp.or.jp/documents/file/04_medical/notice_w/2019_08_15_3.pdf)

16) 公益財団法人 日本骨髄バンク 医師宛通知文 (2010.7.15). 骨髄採取バッグの期限が切れていた事例について.

(https://www.jmdp.or.jp/documents/file/04_medical/notice_w/2010_07_15.pdf)

17) 公益財団法人 日本骨髄バンク 医師宛通知文 (2018.9.14). 骨髄採取後、濾過のためコレクションコンテナを点滴台に設置後に点滴台から落下、骨髄液の一部が流出した事例について (ご報告) .

(https://www.jmdp.or.jp/documents/file/04_medical/notice_w/2018_09_14.pdf)

- 18) 公益財団法人 日本骨髄バンク 医師宛通知文（2010.9.3）. 骨髄運搬バッグから骨髄液が漏出した事例.
(https://www.jmdp.or.jp/documents/file/04_medical/notice_w/2010_09_03.pdf)
- 19) 公益財団法人 日本骨髄バンク 医師宛通知文（2010.12.16）. 骨髄運搬バッグのフィルター連結部のコネクターからチューブが外れた事例.
(https://www.jmdp.or.jp/documents/file/04_medical/notice_w/2010%2012%2015%2001.pdf)
- 20) 公益財団法人 日本骨髄バンク 医師宛通知文（2018.12.14）. 骨髄液を 200 μ m フィルターでろ過処理(ボーン マロウ コレクションキット使用)ができなかった事例について.
(https://www.jmdp.or.jp/documents/file/04_medical/notice_w/2018_12_14_1.pdf)
- 21) 公益財団法人 日本骨髄バンク 医師宛通知文（2020.03.13）. 骨髄液バッグのシーリングについて. (https://www.jmdp.or.jp/documents/file/04_medical/notice_w/2020_03_13.pdf)
- 22) 公益財団法人 日本骨髄バンク 医師宛通知文（2016.4.21）. 骨髄液バッグのシーリングについて(注意喚起).
(https://www.jmdp.or.jp/documents/file/04_medical/notice_f/anzen_bag20160415.pdf)
- 23) 公益財団法人 日本骨髄バンク 医師宛通知文（2023.3.30）. 骨髄採取マニュアル(バッグのシーリング方法)変更について(通知).
(https://www.jmdp.or.jp/documents/file/04_medical/change_sealing.pdf)
- 24) 高橋典子、田野崎隆二、酒井紫緒、岸野光司、梶原道子、伊藤経夫、池田和彦、原口京子、渡邊直英、上田恭典、松本 真弓、高梨美乃子. 骨髄移植片に含まれる有核細胞数測定法の施設間差の検討. 輸血細胞治療学会誌. 2017; 63: 120-125.
- 25) 公益財団法人 日本骨髄バンク 医師宛通知文（2022.9.29）. 骨髄採取マニュアル【移植骨髄液の有核細胞数測定に関する提言】追加について（通知）
(https://www.jmdp.or.jp/documents/file/04_medical/manualchange_nucleatedcellcount.pdf)
- 26) 原口京子、坂井和巳、中川美子、渡邊英由子、渡邊玲、岡崎江里子、大矢未来、石橋小百合、佐久間香枝、西村加世、小室泰司、土岐典子、大橋一輝、奥山美樹. 骨髄移植片に含まれる有核細胞の、手法と自動血球分析装置による計数の比較第 2 報(会議録). 輸血細胞治療学会誌. 2021; 67: 323.
- 27) 原口京子、荒賀智永、木次幸、成島清美、西村美佐子、石和田萌笑、本間柚乃香、河合英由子、渡邊玲、飯村稜子、石橋小百合、佐々木純子、佐久間香枝、新谷直樹、遠矢嵩、清水啓明、名島悠峰、小林武、土岐典子、奥山美樹. 電気抵抗方式の血球計数装置は骨髄移植片に含まれる有核細胞の計数に適さないか(会議録). 輸血細胞治療学会誌. 2024; 70: 300.
- 28) 高橋敦子、長村登紀子. ラベリング. 細胞治療認定管理師制度指定カリキュラム第 2 版. 細胞治療認定管理師制度審議会カリキュラム委員会 編集. 中外医学社; 2021. p83-85.
- 29) ICCBA. ST-004 ISBT 128 Standard Labeling of Cellular Therapy Products.
https://www.isbt128.org/_files/ugd/1a7593_bc645387cce14019a5ac758271c565cd.pdf
- 30) 公益財団法人 日本骨髄バンク 医師宛通知文（2018.12.14）. 骨髄/末梢血幹細胞パッ

グの取扱いについて(注意喚起).

(https://www.jmdp.or.jp/donor_safety/pdf/doctor/20181214-2.pdf)

(執筆者:原口京子、池田和彦、査読者:上田恭典)

第4.1章 アフェレーシスによる細胞採取総論

はじめに

アフェレーシスを用いた細胞採取は、細胞療法で用いる製剤の原料を得るための医療行為であり、本療法における最も初期段階のプロセスとなる。その後の流れとして、採取された細胞がそのまま投与される場合（自家ないし同種末梢血幹細胞採取や同種ドナーリンパ球採取など）と、得られた細胞を原料に拡大培養・ウイルスベクターによる新たな形質導入を目指す場合（キメラ抗原受容体（CAR）T細胞療法など）の大きく二つに分けられる。

このように、アフェレーシスで得られる細胞は、安全性や効用といった最終製品の品質担保に極めて重要な存在であり、FACT-JACIE 基準においても、多くの項目が示されている。本稿ではこのうち、1. 環境、2. 人員体制、3. 機器管理と手順書管理、4. ラベル発行と管理、5. 保管と出庫に注目して、具体例を交えながら概説する。アフェレーシスの手技そのものや安全管理については、別稿（4.2「末梢血幹細胞採取」、4.5「リンパ球採取」）を参考にされたい。

1. 環境

病院内でのアフェレーシスの実施場所は、主たる診療科の入院病棟の病室や外来の処置室、手術室、輸血部門の処置室、維持透析を行う透析室など、医療機関によりまちまちである。基本的にはアフェレーシスは「専用エリア」を設けることが望ましい。その際には、ドナーからの細胞採取を行うだけでなく、採取産物・アフェレーシス機器・消耗品・試薬の保管もそのエリア内で行えることが理想的である。

そのエリアに関しては、「十分な広さ」を有した上で、「空気中の微生物汚染のリスクを最小限に抑えるような設計」が望ましく、さらには、「十分な照明、換気、給排水が整った清潔な環境」が FACT-JACIE 基準（C2.1.1）では謳われている。また、温度・湿度（C2.4）や清掃・衛生状況（C2.6）についても、記録が求められている。ただ、これに関しては具体的な方法や数値が明示されていないため、各施設でリスク評価を行い、具体的な手順を定めると良い。

広さに関しては、一般には、アフェレーシスベッドないしチェアが設置でき、機器や必要物品を置いた状態でも、スタッフが医療行為を行うために十分なスペースの確保が必要と思われる。空気中の微生物汚染についても言及されているが、アフェレーシスにおいては血管穿刺を行うものの、カテーテルの長期留置を行うわけではないので、クリーンルームや手術室のような、空気中の微粒子数管理までは不要である。温湿度の推移や清掃状況は、病院内の施設であれば問題ないことが殆どではあるが、そのモニタリングや記録が、一部のCAR-T細胞用のアフェレーシスにおいて将来的に求められることがある。そのため、アフェレーシスが常に適切な環境で行われていることを担保するエビデンスとして、モニタリングな

いし記録の体制を整備しておくことが望ましい。

京都大学病院の場合、透析室の一部を間借りしている状況が続いている。アフェレーシスに完全に特化した部屋の準備は出来ていないが、上記の環境に関するモニタリング・記録は、透析患者の環境管理の一貫として行っている内容を流用できるというメリットがある。また、常時、人工透析を多く担当している臨床工学技士や看護師など、体外循環に精通したメディカルスタッフによるアフェレーシスの管理がなされるため、感染・汚染廃棄物の処理や、標準予防策の徹底はもちろん、急変時の対応も高いレベルで行われることが期待される。温湿度については、従来、病院の中央管理部門でモニタリングや記録が取られていたが、現場レベルでそれらを確認することはなかった。しかし、CAR-T 細胞療法開始時の監査において、現場担当者によるモニタリング・記録確認が必須とされたため、室内および材料保管庫への温湿度計の設置を行い、日々始業時に確認する運用と改めた。

一方、兵庫医科大学病院の場合、輸血・細胞治療センター内にアフェレーシスならびに自己血採血用の部屋を備えているため、部屋の環境モニタリング（温湿度、資材、清掃）やその記録は輸血・細胞治療センター技師が管理している。アフェレーシスには看護師1名、臨床工学技士1名が常駐し、患者ケアならびにアフェレーシス機器のオペレーションを行なっている。医師が常駐していないため、急変時には状況に応じ院内救急医療体制もしくは最寄りの病棟へ応援要請する運用となっており、看護師、臨床工学技士、臨床検査技師に加え、救命救急センタースタッフも交えた定期的なシミュレーションを通して、危機対応への意識確認を行なうなど、リスクに基づいた管理体制を構築している。

2. 人員体制

アフェレーシスに関する人員の確保は、各施設にとって重要な課題である。理想的には、アフェレーシス全体のマネジメントを行う「細胞採取責任者」と、得られた細胞の品質を管理する「品質管理者」を、それぞれ独立して設け、いずれの役割者も実際の投与を行う診療科担当者とは独立した立場であることが望ましいとされている（FACT-JACIE 基準 C3）。ただ、これは、本邦の場合一部のごく限られた施設を除いて到底実現不可能な要件であり、下記に挙げるそれぞれの役割を認識した上で、兼任しながら業務分担する体制が現実的と思われる。

細胞採取責任者：アフェレーシスに関しての総合的な責任者であり、品質管理者と連携し、採取された細胞の適切な管理にも責任を持つ。アフェレーシスの手順の策定、適格性の判断、状態変化時の対応、採取された細胞の取り扱い・管理など、その範囲が幅広いことから、細胞採取に関して十分な経験を持った医師であることが望ましい。細胞採取責任者は、採取後の細胞処理を担当する細胞処理責任者と独立する存在ではあるが、兼任は許容される。また、得られた細胞を用いて治療を行う、臨床部門の責任者とも独立した立場であることが理想的だが、実際の所は兼任をしているケースも多い。

品質管理者：アフェレーシスによって採取された細胞や、その後の処理を行った際の品

質を適切に管理することが求められる。また、必要な標準作業手順書の見直し、変更、承認に関する規約を作成することも重要な役割である。職務に必要な知識、技術内容からは、日本輸血・細胞治療学会の「細胞治療認定管理者」資格を有することが望ましい。ドナーや患者に対する医療行為を直接行うわけではないため、要件に医師資格は不要である。品質管理者は、細胞採取と細胞処理の担当者をそれぞれに独立して任命し、お互いにチェックし合うことが理想ではあるが、兼任も可と考える。

これらの管理者や責任者のもと、アフェレーシスにおいては、多くの看護師、臨床工学技士、検査技師、細胞培養士などのスタッフが重要な役割を果たす。全体の体制における各人の位置づけを定期的に確認するとともに、各人に与えられた役割を十分に果たすために、定期的に知識や技術のアップデートを図ることが重要である。実際、FACT-JACIE 基準（B3.5.3）では、細胞採取に関わるスタッフは、年間 10 時間以上の血液細胞治療に関する教育プログラムに参加し、その記録を残すことが求められている。日々の臨床に追われるスタッフが、このような時間を捻出することはハードルが高いが、コロナ渦で多くの講演会・学会が「ハイブリッド」形式での参加が可能になったことを逆にとり、通常であれば参加出来ないようなプログラムに参加してみることは一考に値する。

京都大学病院の場合、細胞採取責任者および品質管理者は、細胞療法センターの2名の医師（いずれもバックグラウンドは血液内科医）が務めており、関連する診療科（主には血液内科や小児科）とは緊密に連絡は取るものの、独立した立場から、依頼内容の精査、適格性の判断などを行っている。手順書や記録書の作成や見直しは、文書管理責任者・変更管理責任者として、臨床検査技師や臨床培養士などのスタッフが、実際の作業におけるフィードバックを掛けながら担当している。

一方、兵庫医科大学病院の場合、品質管理者の下に、細胞採取部門責任者、細胞調製部門責任者、検査部門責任者を置き、検査部門責任者以外は輸血・細胞治療センター所属の医師が、検査部門責任者は検査技師が務めている。細胞調製部門には看護師・臨床工学技士・臨床検査技師の責任者を配置し、変更対応など迅速にコミュニケーションが取れるようにしている。文書管理や変更管理、教育プログラムは輸血・細胞治療センターの臨床検査技師が一元管理し、適宜フィードバックする。また、年に1回のマネジメントレビューにて文書管理や変更管理、不具合の是正やリスクアセスメント状況、その他品質維持向上のための年間行動計画の進捗状況を周知し、部門横断的な組織の連携を深めている。

3. 機器管理や手順書管理

アフェレーシスに用いられる機器類のうち、特に血液成分分離装置（TerumoBCT 製 SpectraOptia など）は、安全にそして効率よく細胞を採取するために必須の機器である。設置時に据付時適格性確認（IQ）および稼動性能適格性確認（OQ）を確実に実施するとともに、毎回の使用前には動作確認を行い、細胞採取の工程記録として、機器の使用ログも作成と保存も必須である。さらには、製造業者の推奨に従い、定期的な保守点検を行うことが重要

である。このように十分な管理を行っても、突発的な故障の可能性は否定できない。アフェレーシスは、日程変更不可である場合が多いため、可能であれば複数台を所有し、いつでもバックアップ可能な体制を作っておきたい。

一方、アフェレーシスの安定した実施のためには、ハード面（機器）に加えて、ソフト面（手順書）も極めて重要である。アフェレーシスは臨床現場での医療行為の側面が大きく、このような書類が作成されていないことも多いが、細胞採取に関する品質管理計画を適切に策定する上でも、標準作業手順書（SOP）や作業工程記録書の文書の作成と管理（フォーマットの標準化、識別番号の付与、承認システム、版管理、定期的レビュー）が必要である。もし共有出来るものがあれば、提供して頂きたい。手順書内には、以下の内容を記載しておくことが望ましい（FACT-JACIE 基準 C5.1）。血液細胞の採取（アフェレーシス中の手順書）、取り違えと交差汚染の防止、採取産物バッグへのラベル貼付、採取産物の有効期限、採取産物の保管・採取産物を他施設に出庫する際の手順、不具合が起きた時の対応措置、清掃、衛生管理の手順および責任者、個人防護具の装着を含めた標準予防策（スタンダードプリコーション）の適用。なお、標準作業手順書からの逸脱が予定されている場合は、細胞採取責任者が事前に承認し、品質管理者によるレビューを受けることが必要である。

血液細胞の採取（アフェレーシス）に関して、その適格性や幹細胞動員法、また採取中の手順についてのさらなる詳細は、日本造血・免疫細胞療法学会により発行されている「造血幹細胞採取ガイドライン」を準拠する。

4. ラベル発行と管理

患者ないしドナーからアフェレーシスにて採取した細胞は、目視ではその内容を判断することは困難となるため、識別のために採取バッグに適切なラベルを貼付することが重要である。その際、細胞の種類（造血幹細胞、リンパ球）や由来（自家、同種）によらず、院内で発行するラベルは、その形式を統一したうえで、細胞採取責任者の承認を得ておく。

ラベルに記載する内容としては、「識別番号、採取産物名（製剤名）、患者名およびID、ドナー名およびID、採取日時」が最低限必要で、防水性のあるラベル用紙に、システムから自動印字される方式が望ましい。ラベルはアフェレーシスの前日ないし当日朝に印刷し、ラベル発行したことを記録しておくことで、二重発行を防ぐ工夫が必要である。アフェレーシス依頼内容と印字情報とを2人以上で照合したのち、アフェレーシスベッドにおいて患者リストバンドなどとの再確認をした上で、可能な限り細胞採取開始前に採取バッグに貼付する。

骨髄バンクを介する場合や、CAR-T 細胞療法でメーカーに細胞を送付する場合、採取バッグに貼付するラベルが指定されていることがある。その際には、指定されたラベルには、上記の全情報が網羅されていないことも多く、それだけではアフェレーシスを行うことが難しい。そのため、京都大学病院や兵庫医科大学病院においては、あくまで当院でのラベルを発行し、バッグに貼付してアフェレーシスの開始準備をした上で、指定されたラベルをさらにダブルチェックして貼付する運用を行い、取り違え防止策としている。

5. 保管と出庫

アフェレーシスにより採取された細胞は、通常、1-2 時間以内に速やかに出荷される（そのままの形で患者に投与されるか、製薬メーカーないし他施設への運搬）か、院内にて細胞処理される。ただ、採取後、搬送が翌日になる場合（骨髄バンクを介した、非血縁者間同種末梢血幹細胞採取など）や、院内での事情により細胞処理が翌日になる場合、細胞をそのままの形（通常は 4℃）で保管する場合がある。天候や交通事情などにより、不測の事態で保管が必要になることもあるため、あらかじめ採取産物の保管方法、条件、期間に関する手順を作成しておくことが重要である。

保管に際しては、各製剤に適した保管温度（範囲）を標準作業手順書に明記する必要があるが、通常の場合は、2～6℃であり、赤血球製剤と同等であることから、保管には血液保管庫を用いることが多い。保管中は、必要に応じて施錠するなど保管場所の管理を行い、取り換え、汚染、交差汚染、部外者による無断持ち出しを防止することが重要である。また、温度の逸脱を防ぐため、少なくとも 4 時間毎に温度を継続的にモニターし記録するシステムに加え、異常時の警報音発報システムおよび定期保守点検（夜間や休日などに、現場が無人になる場合は、担当者への自動連絡システムを含む）が必要となる。さらには、保管庫の突然の故障に備え、代替機の準備も望ましい。

アフェレーシスで得られた産物バッグ出庫においても、品質管理の観点から、厳重な規定が必要である。例えば、一次梱包容器であるバッグが破損した際に、細胞の漏洩リスクを考え、包装袋などの二次梱包容器を用いて、さらに包装することが望ましい。院内の細胞処理部門や患者ベッドサイドへの移動ではなく、他施設など、院外に向けて出庫する際には、内容物の漏洩、衝撃、圧力変化、温度変化等に耐えられる材料で作られた外部容器に入れることが望ましい。場合によっては、外部の運送会社と連携するなどするとよい。CAR-T などの細胞療法用のアフェレーシスにおいては、メーカーが設定する手順書に従った梱包が必要である。いずれの場合も、採取産物バッグの出庫時には、払出担当者と受取担当者（臨床診療科や搬送業者）が一緒に、出庫依頼票などの一次情報とバッグに貼付されたラベルとを用いて、細胞種類、患者氏名・生年月日、採取日、採取量などを読み合わせた上で、バッグの破損や異物の混入がないか、目視による外観チェックを行った後に、出庫を行う。この際、取扱者（払出担当および受取担当者名とサイン）と日時を記載した払出ないし出庫記録を確実に作成することで、chain of custody を確実に担保することが重要である。一連の管理は、品質をより確実に担保するため、当該施設の細胞処理部門（輸血部等）が主体となっていくことが望ましい。

参考文献

- 1) INTERNATIONAL STANDARDS FOR HEMATOPOIETIC CELLULAR THERAPY PRODUCT COLLECTION, PROCESSING, AND ADMINISTRATION 7th Edition (March 2018)
- 2) 日本造血・免疫細胞療法学会「造血細胞移植ガイドライン・造血幹細胞採取」(2022年5月)

(執筆者:吉原哲、池本純子、新井康之、査読者:尾上和夫)

第4.2章 末梢血幹細胞採取

はじめに

末梢血中には、通常、造血幹細胞等の未分化な細胞はほとんど流れていない。しかし、抗腫瘍剤による骨髄抑制の回復期には、骨髄中より末梢血中にこれらの細胞が一時的に動員され濃度が上昇することが分かり¹⁾、この時期の細胞を繰り返し採取して移植に用いることが行われるようになった²⁾。その後、末梢血中に造血前駆細胞が動員される時期に、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)などの造血刺激因子の投与を併用することで、造血前駆細胞の動員が増幅されることが判明し³⁾、現在、日本では、腫瘍性疾患での自家造血幹細胞移植に際しては、抗腫瘍剤による骨髄抑制の回復期に G-CSF を併用して、動員された末梢血幹細胞を採取し移植に用いることが一般的に行われている。また、G-CSF 単独でも大量に投与することで、造血前駆細胞、造血幹細胞が末梢血中に動員されることが判明している³⁾。本邦で2017年2月に発売された Plerixafor(モゾビル®皮下注 24 mg)は、CXCR4 ケモカイン受容体拮抗薬で、造血幹細胞表面の CXCR4 に可逆的に結合することで、骨髄ストローマ細胞表面に発現する間質細胞由来因子 SDF-1(CXCL12)との結合を阻害する。これにより、骨髄から末梢血への幹細胞動員が促進される⁴⁾。多発性骨髄腫患者を対象に行われた第三相多施設無作為化試験では、患者体重(kg)当たり 6×10^6 個以上の CD34 陽性細胞を2回以下のアフエレーシスで採取できた患者は全体の 71.6%で、プラセボ群の 34.4%に比べて有意に多かった⁵⁾。健常人ドナーに対しては現時点では使用できないが、腫瘍性疾患に対する自家末梢血幹細胞採取に対しては、多くの施設で G-CSF に Plerixafor を併用している。

本稿では、末梢血幹細胞採取の考え方、具体的な留意点を中心に述べる。日本輸血・細胞治療学会、日本造血・免疫細胞療法学会、日本骨髄バンクから、関連したガイドライン⁶⁾やマニュアル⁷⁾が示されているので、参照されたい。現在、末梢血幹細胞採取は、主にテルモ BCT の Spectra Optia®、Fresenius の COM.TEC®を用いて行われている。個々の機種の手扱いについては、各製品のマニュアルを参考にされたい。なお、末梢血幹細胞採取に際しては、各医療機関でそのルールに則り患者・ドナーより同意を取得する必要がある。

自家末梢血幹細胞動員と採取の時期

(1) 化学療法を併用する場合

疲弊した造血環境からの採取は、十分量の幹細胞採取を困難にする。このため、移植適応患者については、出来るだけ採取の容易な時期の計画的な採取が望ましい。

化学療法後の血球回復期に採取する。採取直前の化学療法は強力なものが望ましい。ニトロソウレアは用いない。シクロフォスファミド、シタラビン、エトポシドを含むレジメンがよく用いられ、治療強度が弱い場合には、これらの薬剤を増量してもよい。

1) G-CSF の開始時期および投与量

経過中、特に感染等が生じていない場合には、骨髓抑制からの回復時期に G-CSF を開始する。血球回復の判断には、網状赤血球の反転増加、単球、血小板、好中球数の反転増加のいずれかが生じるタイミングで G-CSF を開始すると、白血球の回復に同期して CD34 陽性細胞が増加し、採取のタイミングがとりやすい。感染症を生じた場合には、好中球数を確保するため、前治療の強さに応じて、G-CSF の早期の開始を考慮する。G-CSF 投与量は、Filgrastim の場合最大 $400 \mu\text{g}/\text{m}^2$ (患者体表面積)、Lenograstim の場合最大 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ (患者体重) である。

2) 採取時期

白血球数の回復が急峻であれば、確実な採取が期待できる。採取時期は、末梢血の CD34 陽性細胞数のモニタリングを行い、この数が $20 \text{ 個}/\mu\text{L}$ を超えてから、ないしは白血球が $5,000/\mu\text{L}$ を超えかつ血小板が $75,000/\mu\text{L}$ を超えてから採取をするのが目安となる。採取のタイミングの決定には、末梢血の Hematopoietic progenitor cell (HPC) の測定も有効との報告がある⁸⁾。採取が週末にかかり、保存も含めて施行が困難な場合には、途中での G-CSF の減量やスキップが可能な場合もある(図1)。

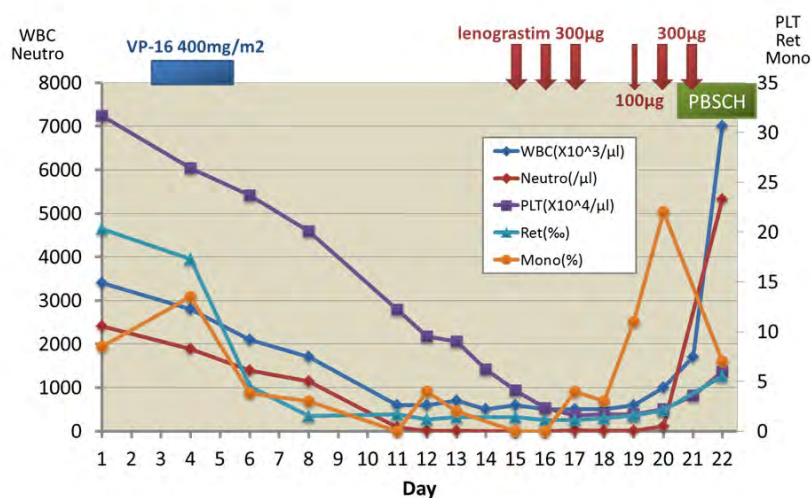


図1 幹細胞動員中に G-CSF をスキップした例(倉敷中央病院自験例)

(2) G-CSF 単剤での幹細胞動員

化学療法施行歴のある患者における G-CSF 単剤での幹細胞の動員については、健康人ドナーからの採取(次項)に準じるが、必要量の採取が困難な場合が多いことが予想される。

(3) G-CSF + Plerixafor での幹細胞動員

Filgrastim の場合最大で $400 \mu\text{g}/\text{m}^2$ (患者体表面積)、Lenograstim の場合最大で $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ (患者体重) を連日皮下注し、PBSC 採取の 9-12 時間前に Plerixafor $240 \mu\text{g}/\text{kg}$ (患者体重) を投与する。European society for blood and marrow transplantation (EBMT) は、アフエレーシス前日の末梢血中 CD34 陽性細胞数が $20 \text{個}/\mu\text{L}$ より多ければ G-CSF 単独投与のみで採取、 $10 \text{個}/\mu\text{L}$ 未満の場合は Plerixafor を併用することを推奨し、 $10 \sim 20 \text{個}/\mu\text{L}$ の場合には患者の状況により判断するとしている⁹⁾。Plerixafor 使用による有害事象としては、ショック、アナフィラキシー、脾腫、脾破裂、錯感覚、頭痛、下痢、悪心、注射部位反応、疲労などが挙げられ、いずれも軽度であるが、採取中に下痢腹痛症状を呈する症例もあるので注意が必要である。

健常人ドナーからの造血幹細胞採取

(1) 末梢血幹細胞採取におけるドナー選択の特殊性

G-CSF 投与によって、白血球数が増加し機能が亢進するとともに、血小板凝集能が亢進し血栓傾向が増す。従って、血管にリスクがある場合、血栓症や虚血性疾患発症のリスクが増大するため、末梢血幹細胞採取ドナーとしては不適格となる。コントロール不良の高血圧症 (収縮期血圧 $>160\text{mmHg}$ 、もしくは拡張期血圧 $>100\text{mmHg}$)、コントロール不良の脂質異常症 (総コレステロール $>240\text{mg}/\text{dL}$ 、HDL コレステロール $<40\text{mg}/\text{dL}$ かつ LDL コレステロール $>160\text{mg}/\text{dL}$ 、LDL コレステロール $>180\text{mg}/\text{dL}$) は、このような理由から、基本的に不適格となる⁶⁾。また脾臓破裂の報告があり、脾腫について、腹部超音波検査で確認することが望ましい。わが国では G-CSF 投与を受けた血縁ドナーにおける急性骨髄性白血病の発症の報告が 2 件、骨髄異形成症候群の報告が 1 件ある (日本における造血細胞移植 2022 年度全国調査報告書: 2022 年までに報告された重篤な有害事象 (末梢血) (http://www.jdchct.or.jp/data/report/2022/donor_pb.pdf) が、我が国での日本造血細胞移植学会 (現日本造血・免疫細胞療法学会) の前向き研究¹⁰⁾や、EBMT での後ろ向き研究¹¹⁾、米国 National Marrow Donor Program (NMDP) の非血縁末梢血幹細胞採取の調査¹²⁾では、造血器腫瘍の増加はみとめられていない。G-CSF 大量投与による長期的なリスクについては引き続き長期に及ぶ観察が必要である。また、内頸静脈からの PBSC 採取に関して、死亡例が海外の健常人同種末梢血幹細胞採取ドナーにおいて 2 例、国内の自家末梢血幹細胞採取において 2 例報告されていることから、採取には原則として肘静脈を用いる。確保不可能な場合には大腿静脈を用いる。骨髄バンクドナーでは、両上肢 (正中静脈等) で体外循環が可能な程度太い血管が確保できない場合はドナー不適格となる⁷⁾。非血縁ドナーの適格性の指標については、ドナー適格性判定基準 HP 版 (日本骨髄バンク) を参照されたい。

https://www.jmdp.or.jp/documents/file/04_medical/tekikakukijun_20230330.pdf

(2)ドナーよりの採取

血縁ドナー年齢は、10 歳以上 65 歳以下とされている。ただし 61 歳以上 65 歳以下、10 歳以上 18 歳以下については、各施設のしかるべき機関の承認を受ける必要がある⁷⁾。10 歳未満の小児は末梢血幹細胞ドナーとはしない(骨髄ドナーの場合は 1 歳未満不可)。非血縁ドナーの場合は 20- 55 歳となる。

血縁ドナーの安全確保、依頼する過程でのドナーの人権への配慮と倫理性の確保は必須の問題であり、主治医以外の医師が、中立の立場でインフォームドコンセントを取る必要があり、可能であれば、造血細胞移植コーディネーター(HCTC)の関与が望ましい。年少者の場合は、特に配慮が必要である。G-CSF 単独投与で採取を行う。

1) G-CSF の投与

G-CSF の使用量は、Filgrastim $400 \mu\text{g}/\text{m}^2$ (ドナー体表面積)、Lenograstim $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ (ドナー体重)皮下注である⁶⁾。 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ (ドナー体重)/日までは、G-CSF 用量依存性に CD34 陽性細胞動員が増し、副作用も許容範囲とされる¹³⁾。米国での Filgrastim の標準使用量は、 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ と、我が国での Lenograstim での量であることに留意する必要がある。

G-CSF を 1 日 1 回もしくは 2 分割し皮下注して、4 日目ないし 5 日目から採取を開始する。

採取開始は、最終の G-CSF 投与から 4 時間以降が望ましい。1 日で、十分量が採取できなかった場合には、翌日も G-CSF を投与し、採取する。6 日間 G-CSF を投与した場合、脾臓破裂の危険性が増すといわれており、特に注意が必要である¹⁴⁾。また、7 日間の投与では、動員される幹細胞数は低下するといわれているので、通常は行わない¹⁵⁾。

G-CSF については 2022 年 2 月に、持続型 G-CSF 製剤注「ジーラスト®」(一般名:ペグフィルグラスチム(遺伝子組換え))が同種末梢血幹細胞移植のための造血幹細胞の動員のために使用可能となった。この場合投与量は 7.2 mgを1回皮下注となる。

G-CSF の投与は入院外来を問わない。外来投与の場合には、各施設でドナーが確実に担当医師や看護師、コーディネーターに連絡がとれる体制を整える必要がある。

2) G-CSF 投与の副作用

G-CSF 投与により、ショック、間質性肺炎といった重篤なものから、骨痛、全身倦怠、インフルエンザ様症状、肝酵素上昇、尿酸値上昇など様々な全身症状が生じる可能性がある。健常人非血縁ドナーにおける G-CSF によるアナフィラキシー様症状も数件報告されているため、投与後は慎重な経過観察が必要である。重篤な有害事象はまれであるが、心筋梗塞、脳血管障害、脾破裂などの報告がある。G-CSF 投

与に伴い、痛風性関節炎や虹彩炎が増悪したという報告もある⁶⁾。骨痛に対しては、出血傾向を助長する可能性のあるアセチルサリチル酸は用いない。G-CSFによる過剰な白血球増加、血小板減少、副作用としての全身症状の出現に対応した減量基準が定められている(表1⁷⁾)。持続型 G-CSF に関連する副作用としては、血液中 ALP 増加、乳酸脱水素酵素の増加、背部痛、血小板減少、血管炎、頭痛、などが報告されている。

検査所見			G-CSF投与量の減量・中止
白血球数	50,000/ μ L以上		50%減量
	75,000/ μ L以上		投与中止
血小板	100,000/ μ L未満		50%減量
	50,000/ μ L未満		投与中止
症状	程度	Grade (CTC) *	G-CSF投与量の減量・中止
骨痛	自制不能	4	50%減量、24時間後改善されなければ投与中止
頭痛	自制不能	4	50%減量、24時間後改善されなければ投与中止
吐き気	経口摂取不可能	3以上	投与中止
嘔吐	24時間で2～5回嘔吐	2	50%減量
	24時間で6回以上嘔吐	3以上	投与中止
身体反応	痛みもしくは腫れを伴う炎症・静脈炎		50%減量、24時間後改善されなければ投与中止

*CTC：Common Toxicity Criteria；共通毒性基準（文献7より引用改変）

表1 G-CSF の減量・中止基準

バスキュラーアクセス

処理血流量が多いほど、採取 CD34 陽性細胞数は多くなる。しっかりした脱血路の確保は、安定したアフエレーシスにとって最も重要である。中心静脈の確保は、アフエレーシスを容易にするが、幹細胞採取に伴う死亡事故の一部は、内頸静脈などのバスキュラーアクセス確保に関連している¹⁶⁾。このため、骨髄バンクでは末梢でのルート確保が義務付けられ、採取当日に末梢ルートによるアフエレーシスが困難な場合にのみ、大腿静脈での中心静脈確保が許容されている⁷⁾。末梢から脱血するときは 16～18G 側孔付留置針を用いると十分な血流を確保しやすい。大腿静脈を確保する場合、しばしば、ダブルルーメンの留置カテーテルが用いられるが、血栓症のリスク等にも十分配慮する必要がある。大腿静脈確保に側孔付留置針を用いると 16G 程度の太さで十分な血流を得ることが出来る。留置針の場合は、末梢も含めアフエレーシス終了後毎回抜針する。大腿静脈穿刺を行った場合には、採取当日は入院が必要である⁷⁾。

消毒方法は、有機物がある場合はポビドンヨードの殺菌効果が減少するため、消毒前に 70%イソプロパノールまたは消毒用エタノールで皮膚の汚れを十分に拭き取り、ポビドンヨードが乾燥してから行う²⁾。穿刺部にやむを得ず直接触れる場合は、末梢血管であっても滅菌手袋を使用する¹⁷⁾。

中心静脈カテーテル挿入には感染のリスクを伴うため、必ず無菌操作で行う。高度無菌遮断予防策（マキシマルバリアプリコーション）を講ずることで、標準予防策（スタンダードプリコーション）に比べカテーテル関連血流感染（CRBSI）の発生を低減できるとされている¹⁸⁾。

小児患者における自家末梢血幹細胞採取に際しては、年齢体格に合わせた選択が必要であるが、乳児においても、橈骨動脈に 22G の留置針を使用することで、20～25mL/分の血流を得ることが可能である。血流量は、体重(kg)×1.5ml/min を超えないようにする。返血路も同様に 22G 留置針が必要である。留置針穿刺に際しては、30 分ないし 60 分前に穿刺部位の皮膚に貼付用局所麻酔剤やエムラクリーム・パッチなどを使用するとよい。小児は症状を訴えられないため、クエン酸中毒には十分に注意する必要がある。体外循環量が 10ml/kg (患者体重)を超えないようにする必要があり、25 kg未満の小児からの採取の場合にはあらかじめ赤血球で回路のプライミングを行う。低体重患児の幹細胞採取については、十分な経験と設備の整った施設で慎重に行う必要がある。

抗凝固剤

通常は、ACD-A 液を用いる。一部の施設で少量のヘパリンの添加が行われている。

処理血液量の決定

(1)採取量

採取量は、現在、幹細胞採取量によく相関するとされる CD34 陽性細胞数で評価されることが多い。しばしば、 2×10^6 個/kg が最低目標量とされる。しかし、 $1-2 \times 10^6$ 個/kg (体重)でも生着は可能とされる。また、多発性骨髄腫で2回目の自家移植を念頭に置く場合や、ハプロ同種移植で生着不全のリスクが高い場合には、 4×10^6 個/kg (体重)を目標とする場合もある。この量以下では移植が成立しないわけではないこと、実際に行われた造血幹細胞移植における CD34 陽性細胞数の報告を見ると、この量が至適量ではないことに留意する必要がある(表 2)。

CD34 陽性細胞数はフローサイトメトリーを用いて測定される。国際的に標準化された ISHAGE プロトコールに則りシングルプラットフォームで実施されることが推奨される¹⁹⁾。

	CD34 BM ($\times 10^6/\text{kg}$) Median(Range)	N	CD34 PB ($\times 10^6/\text{kg}$) Median(Range)	N		Reference
1	2.75(1.94-4.53)	278	7.70(5.43-11.28)	273	Unrelated	Claudio Anasetti et al. The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE, 2012
2	0.9(0.3-.29)	54	3.6(0.3-11.2)	56	related	Jan J. Cornelissen et al. Experimental Hematology, 2003
3	2.7(0-154.5)	160	5.8(1.5-68.3)	163	related	Norbert Schmitz et al. Blood, 2002
4	2.5(1.0-4.8)	32	6.9(1.0-29.8)	39	related	Mary E. D. Flowers et al. Blood, 2002
5	2.4(0.1-14.3)	118	6.4(0.7-32.0)	109	related	Stephen Couban et al. Blood, 2002
6	2.4 (0.8-10.4)	91	7.3(1.0-29.8)	81	related	William I. Bensinger et al. The New England Journal of Medicine, 2001
7	2.6(0.8-6.3)	28	7.2(1.9-19.9)	29	related	James Morton et al. Blood, 2001
8	1.5(0.6-2.6)	19	3.7(1.4-12.3)	20	related	Ray Powles et al. THE LANCET, 2000
9	2.4(0.5-8.6)	52	6.6(1.5-19.2)	48	related	Dider Blaise et al. Journal of Clinical Oncology, 2000
10	2.7(0.7-4.7)	20	3.1(1.8-7.7)	30	related	D Heldal et al. Bone Marrow Transplantation, 2000
11	-	-	4.4(2.37-13)	15	related	HK Mahmoud et al. Bone Marrow Transplantation, 1999
12	5.3(1.2-17.5)	19	4.7(1.26-71.6)	18	related	AC Vigorito et al. Bone Marrow Transplantation, 1998

表2 論文報告されている移植された骨髄および末梢血 CD34 陽性細胞数

(2) 目標処理量の決定

採取に当たっては、遠心分離装置の特性、各施設の手技によって差異はあるが、脱血されて遠心分離装置を通過した造血幹細胞、前駆細胞は、一定の割合で回収されることに留意する。従って、本来は、採取時の末梢血中の CD34 陽性細胞数と各施設の平均採取効率(CE2)により、回収量は推測可能である。CE2 は採取前の末梢血中 CD34 陽性細胞数を用いて下記のように算出される。

$$\text{CE2}(\%) = \frac{\text{採取産物 CD34 陽性細胞数}(\mu\text{L}) \times \text{採取産物液量}(\text{mL})}{\text{採取前 CD34 陽性細胞数}(\mu\text{L}) \times \text{ACD 液を除いた血液処理量}(\text{mL})} \times 100$$

ただし、実際の採取施行中の予期せぬ変動のリスクもあるため、CD34 陽性細胞数の中間モニタリングを行って、目標処理量を調整することが望ましい。最大血液処理量については、自家末梢血幹細胞採取においては特に定まっていない。Large volume leukapheresis (LVL) という大量処理をする方法も海外ではよく用いられ、1日で400mL/kg(患者体重)を越える処理を行うことがある。血縁者間では、提供者からの末梢血幹細胞処理量は150-250mL/kg、上限300mL/kg(ドナー体重)で実施される。非血縁ドナーの場合は、目標処理血液量は200mL/kg、上限250mL/kg(ドナー体重)となっている⁶⁾。この際最も問題となるのは血小板数の低下である。採取された幹細胞を含む細胞浮遊液中には、大量の血小板が含まれているため、特に大量の処理を行う場合には、血小板数の低下に留意する必要がある、アフエレーシス中の血小板測定が望ましい。このような点に留意しながら、ドナーの負担を考慮して出来る限り短時間で採取が終了出来るように計画してゆくことが望ましい。

大部分のドナーで生着に十分な PBSC の動員採取が可能であるが、2011 年 3 月から 2022 年 11 月末までの日本骨髄バンクの調査では、1704 例中 71 例(4.2%)の症例で 2×10^6 個/kg 以上の細胞を得ることができなかった。また、動員されていたにもかかわらず機器設定の不備により 2 日間にわたり全く幹細胞が採取されなかった事例も発生していることから、何らかの形で中間モニタリングを実施することが推奨される。

末梢血中の CD34 陽性細胞数の変化(図2)、末梢血 CD34 陽性細胞数と採取産物 CD34 陽性細胞濃度の相関(図3)、倉敷中央病院の採取効率(図4)をしめす。

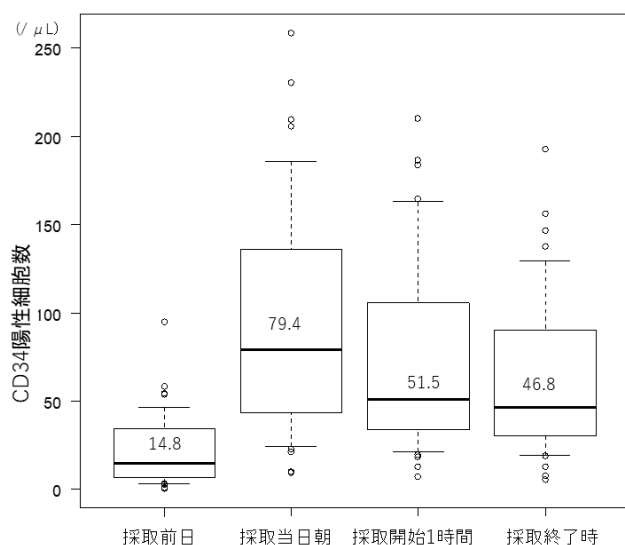


図2 Plerixafor 投与症例における末梢血 CD34 陽性細胞数の動向 (慶應義塾大学病院、39 例)

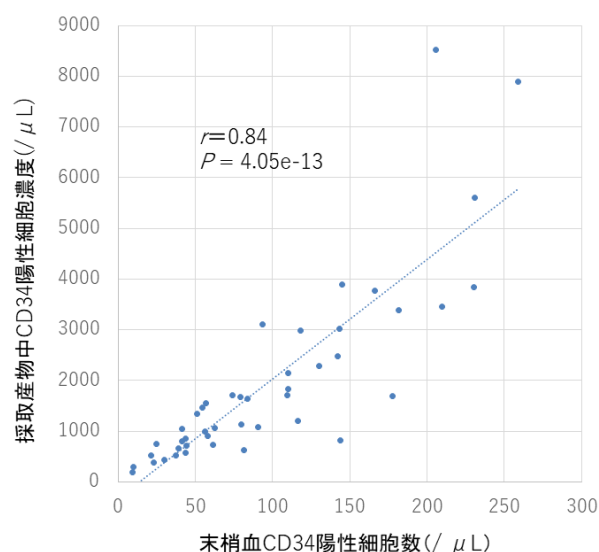


図3 末梢血 CD34 陽性細胞数と採取産物 CD34 陽性細胞数濃度の相関 (慶應義塾大学病院、45 例)

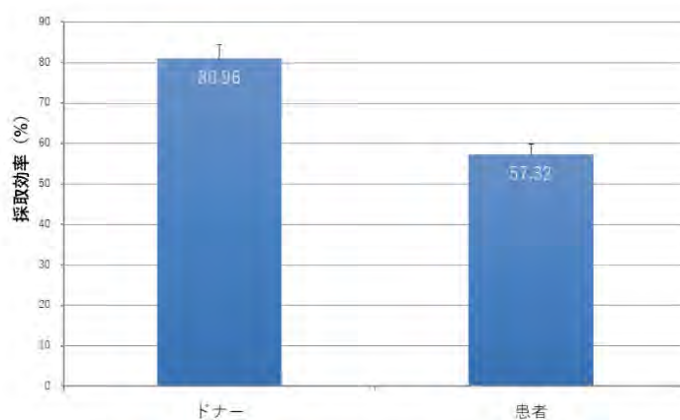


図4 Spectra Optia® CMNC モードでの採取効率(CE2)

採取中の留意点

(1) 血小板減少

アフエレーシス中の血小板数の低下は、特にドナーにとっては、最も留意すべき点である。ドナーからの採取の場合は、終了時の血小板数で5万/ μ L程度を下限とするのが妥当であろう。開始時と途中での末梢血血小板数の測定で、血小板減少の程度は推測可能である。特に処理量を上限近くに設定する場合には、血小板数の減少の予想と血小板数の採取途中での確認が必要である。ドナーでは、アフエレーシス終了時8万/ μ L以下の場合、採取した細胞浮遊液から、多血小板血漿 (PRP) を分離して輸注することが勧められている⁶⁾⁷⁾。Spectra Optia[®]処理中の血小板数の推移について図5Aに示した。

(2) 低カルシウム血症

ACD-A 液は、カルシウムイオン (Ca^{++}) をキレートし、血液が凝固するのを防ぎ、血中 pH を下げ、遠心分離下での血小板凝集を阻害する。末梢血幹細胞採取では、赤血球除去や血漿交換手順に比べ患者体内に残る ACD-A 液が増えるため、低カルシウム血症のリスクが高い。

低カルシウム血症は、総カルシウム濃度ではなく、カルシウムイオン濃度で評価する。採取中の ACD-A 液の注入によるカルシウムイオン濃度の低下は、副作用の出現に最も大きく関係する。発症しやすさは、単位時間あたりの ACD-A 液注入量と持続時間に規定される。グルコン酸カルシウムの静脈内投与により補正する。末梢血幹細胞採取は長時間に及ぶので、グルコン酸カルシウム溶液を返血路の末梢側より持続注入するとコントロールしやすい。グルコン酸カルシウム投与下でも、カルシウムイオン濃度は低下するが、口唇や手指のしびれ等の臨床症状に注意し、症状が深刻化する前に対応する。グルコン酸カルシウムの投与量を増すか、脱血速度を落とすことによって、単位時間当たりの ACD-A 注入量を減らすことで対応する。両者を同時に行うこともある。さらに、症状出現時スポーツ飲料摂取の効果は俊敏であり、何度でも追加投与が可能である上に、過剰投与もなく副作用もない。含有するカルシウム成分以上の効果がもたらされるため、スポーツ飲料の摂取を勧める²⁰⁾。

倉敷中央病院におけるグルコン酸カルシウムの使用方法をしめす。血流量の上限をドナーの場合 1.2×体重(kg)/分、患者の場合 1.6×体重(kg)/分とし、ACD-A 液は機械の初期設定の対血流比 1:12 で開始、グルコン酸カルシウムは、返血路の穿刺針に近い部位から、返血血液に持続注入している。ドナーでは 15A を生理食塩水 500mL に溶解、80～120mL/時 (900～1,350mg/時)、患者では 20A を生理食塩水 500mL に溶解、100～150mL/時 (1,400～2,100mg/時) で持続注入する。このような大量の投与下で、自覚症状はない場合でも図5に示すように低カルシウム血症が生じている。グルコン酸カルシウムの注入量は、脱血速度、処理量、処理時間によって異なるので、各施設の方法に適した注入量を決定する必要がある。処理中のカルシウムイオン濃度の推移について、図5

B に示した。

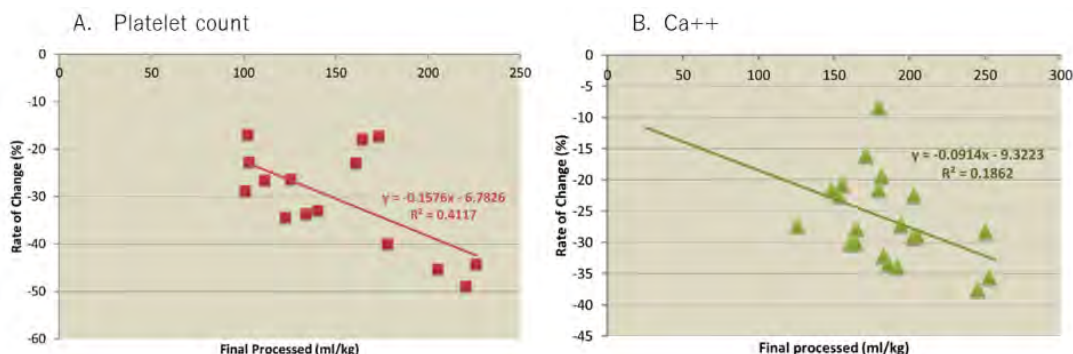


図5 ドナー末梢血幹細胞採取時の処理血液量増加に伴う血液データの推移

(3) 迷走神経反射などの血圧低下

アフエレーシス前に十分なコミュニケーションをとり緊張をほぐすことが重要である。貼付用局所麻酔剤を30分程度前に使用することで、痛みを軽減することが望ましい。過度な安静はより緊張が高まるため、自由に動かせる範囲を説明し、労いの言葉をかけリラックスできる環境を整える。

症状がアフエレーシス開始直後に生じたときは、脱血を中止し、採血側より補液し、返血側より返血を続けつつ反応を見ながら次の処置を考慮する。

症状が経過中に生じたときには、低カルシウム血症に起因するものでないかを考慮しつつ、対応を取る。

(4) 血小板凝集

特に、採取開始時の血小板数が多いドナーからの末梢血幹細胞採取では、コネクタ内で血小板凝集が生じることにより、効率の良い幹細胞の回収が困難になる場合がある。凝集が生じた場合には、ACD-A液の流入比率を増す(多くの場合は同時に脱血流量を下げる)ことで改善を図る。Spectra Optia®では、凝集塊が認められる場合には一時的に対血流比を1:8まで下げることが推奨されている。

(5) 回路の閉塞、脱血困難

留置針穿刺部の腫脹や出血や痛みがないか、回路の屈曲などがないかを確認すると同時に、血圧低下や気分不良がないか患者の状態も確認する。再穿刺など回路を患者から外す必要がある場合、Spectra Optia®では“一時停止”とする。その際、返血側は抗凝固剤が含まれる血液だが、脱血側回路のACD-A液ラインから先の患者側の血液は抗凝固剤が含まれないため、生理食塩液などで流し閉塞を予防する(図6)。採血可能になれば再開する。

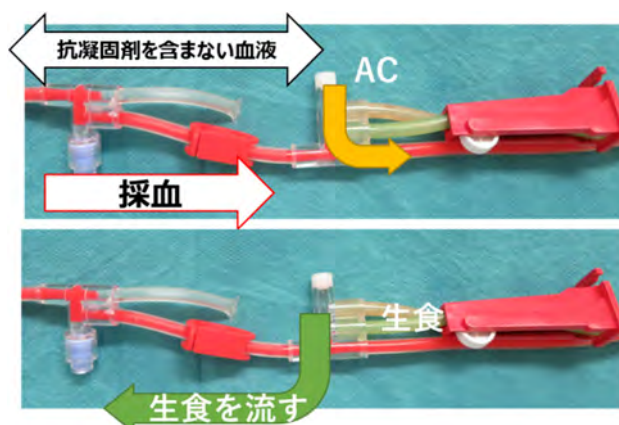


図6 回路閉塞・脱血不良時の一次停止の対応(Spectra Optia®の場合)

(6) 体温調整

末梢血幹細胞採取では G-CSF 製剤の投与の副作用で発熱することがあるが、体外循環中により体温が下がるので、体温調整に注意が必要である。特に、小児の場合、プライミングに赤血球製剤を使用したり、採血流量が遅かったりして回路内の血液が冷え返血温度が低下しやすい。そのため、返血側に血液加温装置の装着を推奨する²¹⁾。ただし、保温にはリラックス効果もあるが、過度の保温は気分不良を起こすことがあるため、患者に応じて保温箇所を検討する。

(7) 血液プライミング

Spectra Optia®では、体重 25 kg 以下では血液プライミングが必要になる。赤血球で適切にプライミングされるように 300mL 以上の赤血球を処理する必要がある。返血ラインで血液加温装置が使用されている場合は、血液加温装置の分を処理量に追加し、チューブセットを赤血球で完全にプライミングできるようにする必要がある。また、輸血歴のない患者の場合、輸血の副反応に注意する。

おわりに

ドナーからの末梢血幹細胞採取は、骨髓採取に比べて明らかに終了後のドナーの負担が少ない方法である。また、現在までに、ドナーに対する長期的合併症についても、大きな問題はないであろうと考えられている。一方で採取に関連した可能性のある死亡の報告は、すべて海外からで、12 例で報告され、そのうち 3 例はアフェレーシス、血管確保に直接関連したミスであり、6例は血管障害、1 例は病歴聴取の不備(鎌状赤血球症)であった(表 3)。手技的な問題の確認と、適切なドナー選択によって回避可能な例が多いことが推測される。わが国でも自家末梢血幹細胞採取のための内頸静脈確保に関連した死亡例が報告されており、中心静脈カテーテルを用いる際には十分に留意する必要がある。

このように、全身麻酔を必要とせず、ドナー負担が少ないと考えられる末梢血幹細胞採取

においても、死亡例がむしろ骨髄採取より多い点は忘れてはならない。しかし適切な管理で危険を回避可能であることが推測される。末梢血幹細胞採取の利点を利用しうる診療体制の確保によって、非血縁者間末梢血幹細胞採取の件数は2010年の導入以降徐々に増加し、2021年現在303件となっている²²⁾。外来通院でのG-CSFの投与、持続型G-CSFの導入は健常人ドナーにおいて大きなメリットであり、今後ますますその数が増加することが予想される。

最後に倉敷中央病院で使用中の、幹細胞採取、ドナーリンパ球採取、顆粒球採取用の指示書(参考資料)を添付した。途中での収量等を見ながら、アフエレーシスの現場で追記していく形を取っている。参考にしていただければ幸いである。

症例	発生年	年齢・性別	発症日	死因
1	1997年以前	61歳・女性	採取4日後	心不全（気管支喘息・高血圧・冠動脈疾患があった）
2	1997年以前	57歳・女性	帰宅後24時間以内	脳卒中（既往歴不詳）
3	1996年	64歳・男性	G-CSF投与終了後	心筋梗塞（冠動脈疾患があった）
4	1998年	73歳・男性	採取数日後	脳血管障害（高血圧・狭心症の既往歴があった）
5	2000年以前	67歳・男性	G-CSF投与6日目頃 （4日目と6日目に採取）	硬膜下血腫（腹部大動脈瘤手術歴・心筋梗塞の既往があった）
6	1999年	47歳・男性	G-CSF投与4日目	鎌状赤血球貧血クライシス （鎌状赤血球貧血の既往があった）
7	2000年以前	未報告・男性	未報告	脳血管障害（既往歴不詳）
8	2001年以前	50歳・女性	カテーテル抜去直後	空気血栓（内頸静脈にカテーテルを挿入し採取した事例における採取時技術ミス）
9	不詳	43歳・男性	15日後死亡 （発生日不詳）	心拍停止（高血圧・喫煙者・採取との関連は不明）
10	不詳	52歳・男性	17日後死亡 （発生日不詳）	心拍停止（喫煙者・採取との関連は不明）
11	不詳	27歳・男性	採取時	心拍停止（採取時技術ミス）
12	2011年	21歳・女性	採取時	出血死（内頸静脈にカテーテルを挿入した際、血管を突き抜けて肺内出血した技術ミス）

（骨髄バンク 「ドナーのためのハンドブック」より改変引用）

表3 末梢血幹細胞採取でのドナー死亡例

参考文献

- 1) Storb R, Epstein RB, Sale GE, et al. Demonstration of hemopoietic stem cells in the peripheral blood of the baboons by cross circulation. Blood. 1977; 50: 537-42.
- 2) Korbling M, Dorken B, Ho AD, et al. Autologous transplantation of blood-derived hematopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with Burkitt's lymphoma. Blood. 1986; 67: 529-32.
- 3) Gianni AM, Siena S, Bregni M, et al. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor to harvest circulating haemopoietic stem cells for auto transplantation. Lancet. 1989;2:580-5.
- 4) Fricker SP, Anastassov V, Cox J, et al. Characterization of the molecular pharmacology of AMD3100: a specific antagonist of the G-protein coupled chemokine receptor, CXCR4. Biochem Pharmacol. 2006; 72: 588-596.
- 5) DiPersio JF, Stadtmauer EA, Nademanee A, et al. Plerixafor and G-CSF versus placebo and

G-CSF to mobilize hematopoietic stem cells for autologous stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Blood*. 2009; 113: 5720-5726.

6) 日本造血・免疫細胞療法学会編. 造血細胞移植ガイドライン 造血幹細胞採取(2022年5月 改訂第2版)

https://www.jstct.or.jp/uploads/files/guideline/02_03_harvest02.pdf

7) 日本骨髄バンク. 非血縁者間末梢血幹細胞採取マニュアルホームページ版 2022年12月15日改訂

https://www.jmdp.or.jp/documents/file/04_medical/PB_manual_20221215.pdf

8) 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*. 2021;60(4):103150.

9) Mohty M, Hubel K, Kroger N, et al. Autologous haematopoietic stem cell mobilization in multiple myeloma and lymphoma patients: a position statement from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone marrow transplant*. 2014; 49: 865-872.

10) Kodera Y, Yamamoto K, Harada M, et al.; Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation; PBSC collection from family donors in Japan: a prospective survey. *Bone Marrow Transplant*. 2014; 49: 195-200.

11) Halter J, Kodera Y, Ispizua AU, et al. Severe events in donors after allogeneic hematopoietic stem cell donation. *Haematologica*. 2009; 94: 94-101.

12) Pulsipher MA, Chitphakdithai P, Miller JP, et al. Adverse events among 2408 unrelated donors of peripheral blood stem cells: results of a prospective trial from the National Marrow Donor Program. *Blood*. 2009; 113: 3604-3611.

13) Waller CF, Bertz H, Wenger MK, et al. Mobilization of peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation: efficacy and toxicity of a high-dose rhG-CSF regimen. *Bone Marrow Transplant*. 1996; 18: 279-283.

14) Hölig K. G-CSF in healthy allogeneic stem cell donors. *Transfus Med Hemother*. 2013; 40: 225-235.

15) Anderlini P, Korbling M, Dale D, et al. Allogeneic blood stem cell transplantation: considerations for donors. *Blood*. 1997; 90: 903-908.

16) 日本骨髄バンク. ドナーのためのハンドブック 2022年

17) 脇本信博編著:実践・輸血マニュアル 自己血輸血から輸血療法全般の理解を求めて, 医薬ジャーナル社, 東京, 2012, pp.92-3

18) O,Grady,NP, Alexander M, Burns LA, et al. Guidelines for the Prevention of Intravascular Catheter-related Infections (血管内カテーテル関連感染予防のための CDC ガイドライン), 2017.<http://www.cdc.gov/infectioncontrol/pdf/guidelines/bsi-guidelines-H.pdf>

19) Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, et al. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell

counts based on the ISHAGE guidelines. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. Cytometry. 1998; 34: 61-70.

20) 岸本昌浩,大戸齊,色摩弥生,相良浩哉他,:末梢血造血幹細胞時の血中イオン化カリウム値の動態,日本輸血学会誌,1999,p456-461

21) Sessler,D.I. Consequences and Treatment of Penoperative Hypothermia. Anesthesiology Clinics of North America.1994;13(3):425-58

22) 日本における造血細胞移植. 2022 年度 全国調査報告書. 日本造血細胞移植データセンター/日本造血・免疫細胞療法学会

(執筆者:山崎理絵、村田真由美、上田恭典、査読者:奥山美樹)

資料

＜末梢血幹細胞採取報告書＞

20 年 月 日

採取方法: ☐ 末梢血幹細胞(自家・同種) 採取回数 回 回目 ☐ ドナー ☐ 病名() レジリエント情報: 非血縁:バンクID - 患者体重 kg 血縁: ID 氏名 体重 kg	
指示内容	指示医() 指示受() 施行者()
使用機器	Spectra Optia
目標細胞数	☐ CD34陽性細胞数 体重当たり: $\times 10^6/\text{kg}$ 個
入力情報	身長: cm 体重: kg 血液処理上限量: mL 当日データ WBC: $\times 10^3/\mu\text{l}$ Ht: % PLT: $\times 10^4/\mu\text{l}$ パスキュラーアクセス: ☐ 直接穿刺 ☐ UKカテーテル
カルチコール量	☐ なし ☐ 自家: 8.5%・5mlカルチコール20A+生食500ml ヘース 100ml/h開始～150ml/hまで ☐ 同種: 8.5%・5mlカルチコール15A+生食500ml ヘース 80ml/h開始～120ml/hまで ☐ 8.5%・5mlカルチコール()A+生食()ml ヘース ()ml/h開始
採取流量 上限	☐ 自家: 患者体重kg $\times 1.6\text{ml}/\text{分}$ まで= $\text{ml}/\text{分}$ まで (AC比: 1:8～15まで) ☐ 同種: ドナー体重 $\times 1.2\text{ml}/\text{分}$ まで= $\text{ml}/\text{分}$ まで (AC比: 1:8～12まで)
サンプリング	☐ PB時 ml 処理時 自家: 総採血量が 体重kg $\times 100\text{ml}$ に近似する時点で 同種: 総採血量が ドナー体重 $\times 50\text{ml}$ に近似する時点で
最終採取量	採取量 ml
自己 多血小板 血漿返血 基準	輸注 ☐ なし ☐ あり 自家: 翌日採取がある場合、血小板数 $5\text{万}/\mu\text{l}$ 以下、ない場合は、 $1.5\text{万}/\mu\text{l}$ 以下で輸注 血縁: 翌日採取がある場合、血小板数 $10\text{万}/\mu\text{l}$ 以下、ない場合は、 $5\text{万}/\mu\text{l}$ 以下で輸注 非血縁: 翌日採取がある場合、血小板数 $10\text{万}/\mu\text{l}$ 以下、ない場合は、 $8\text{万}/\mu\text{l}$ 以下で輸注
細胞処理	分割方法 分割 もしくは比率 ; ; ; ; ;

(倉敷中央病院採取指示書抜粋)

第4.3章 CD34 陽性細胞数の測定

はじめに

造血幹細胞移植(HSCT)を成功させる条件のひとつは、生着に必要な十分量の造血幹細胞を輸注することである。現時点で造血幹細胞を単独のマーカーで示すことはできないが、CD34 陽性細胞がその指標とされ HSCT が実施されてきた¹⁾。HSCT の中でも特に末梢血幹細胞移植のグラフトは、通常末梢血にほとんど存在しない造血幹細胞を G-CSF で動員しアフエレーシスで採取する。動員される造血幹細胞の量は個人差が大きく一定の割合で動員不良例の存在が知られており(poor mobilizer)²⁾³⁾、精確なグラフト中の CD34 陽性細胞数の情報が必要となる。

CD34 陽性細胞数はフローサイトメトリーで測定するが、希少な細胞の定量は測定法により結果の差が大きい。1996 年に ISHAGE (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering; 現 ISCT; International Society for Cell & Gene Therapy)から発表されたガイドライン⁴⁾は、階層化ゲーティングにより debris や血小板その他の細胞の混入を排除することの特徴とし、さらに 1998 年絶対数測定用の内部標準粒子試薬を使用したシングルプラットフォーム法が導入され⁵⁾、標準的な測定法として定着し現在に至る。2017 年には日本語版のガイドラインとして日本臨床検査標準協議会(JCCLS)より「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」⁶⁾が承認された。日本骨髓バンクの施設基準に測定方法の規定はなく⁷⁾、フローサイトメトリーで存在率を求め自動血球分析装置で定量するデュアルプラットフォーム法で測定している施設も少なくなかったため、国際標準では無いもののその記載も残されたが、現在では多くの施設でシングルプラットフォーム法(フローサイトメーター単独で定量まで可能なため、より誤差が生じにくい)が採用されている。フローサイトメーターも進化し、各メーカーの主力機種もガイドライン記載当時から変化している。本項では、新しい機種の情報を追加し、ガイドラインを補填するように記載した。基本的な解説はガイドラインに譲るので、合わせてご確認いただきたい。

検体

造血幹細胞移植にかかわる CD34 陽性細胞数測定の検体は末梢血、骨髓液、末梢血幹細胞、臍帯血である。新鮮検体または凍結保存後に解凍した検体である。

新鮮検体は採取後、直ちに測定することが望ましいが、一時的に保存する場合は 4℃設定の冷蔵庫で保存した方が良くとされる。解凍した検体は可及的速やかに測定することが望ましいが、希釈などを行うことで生細胞率を比較的長時間保てることがある。

必要資材の例

＜試薬・資材の例＞

生食または PBS

血清タンパク (FBS、BSA、アルブミンなど)

精製水

染色用蛍光抗体

・CD45-FITC ・CD34-PE・死細胞検出用試薬 (7-AAD や PI など)

内部標準粒子

溶血剤

FACS 用チューブ

マイクロチューブ

チップ (P-20 用、P-200 用、P-1000 用)

機器調整用試薬 (機器に応じて準備する)

精度管理用試薬 (機器に応じて準備する)

プロセス管理用試薬 (必要に応じて準備する)

・Stem-Trol Control Cells (ベックマン・コールター社:BC 社)

・AQUIOS STEM CD34 Control Cells (BC 社)

・BD™ Stem Cell Control (ベクトン・ディッキンソン社:BD 社) など

<測定キットの例>

Stem-Kit (BC 社)

AQUIOS STEM Kit (BC 社)

BD® Stem Cell Enumeration Kit (BD 社)

基本的試薬は以下のものである。

- ①CD45-FITC、②CD34-PE、③7-aminoactinomycin-D (7-AAD)、④内部標準粒子、⑤塩化アンモニウム溶血剤

<使用備品の例>

フローサイトメーター:3 カラー以上の機器が望ましい。

・BC 社製:Cytomics FC500、Navios、Navios EX、AQUIOS など

・BD 社製:BD FACSCalibur™、BD FACSCanto™ II、BD FACSLytic™ など

マイクロピペット (P-20、P-200、P-1000)

ミキサー vortex など

作業手順

1) 検体準備

測定前に細胞濃度などを確認し、適宜希釈を行う。希釈液には生理食塩水や PBS を

用いる。いずれも血清タンパクを0.5～2%程度添加することが望ましい⁶⁾。

2) 機器準備

使用機器の光学系および流体系の調整や散乱光／蛍光検出器の性能等については、機器の取扱説明書にしたがって使用前に正しく調整、確認しておく。CD34 測定キット等や専用に用意された測定・解析ソフトウェアを用いる場合は、機器、ソフトウェアおよび試薬の取扱説明書にしたがって機器調整、試料調製および測定、データ解析等を行う。

3) 検体処理

シングルプラットフォーム法では CD34/CD45 および死細胞検出試薬で染色した検体と内部標準粒子（既知数のビーズなど）を用いて CD34 陽性細胞の絶対数を測定する。標準粒子を測定直前に添加するタイプと、あらかじめ一定数が試験管に封入されているタイプが市販されている。キットの使用時には取扱説明書に従って操作を行う。

検体については正確に添加することが重要である。そのため、校正されたマイクロピペットなどを使用し、リバー式ピペット法を用い、試験管の壁に検体が付着しないようにゆっくり添加する。なお、標準粒子を添加するタイプの場合は、標準粒子浮遊液も正確に添加する必要がある。

プロセス管理用として陽性コントロールを使用する場合には、検体と同時または事前に取扱説明書に従って染色しておく。

＊溶血試薬は白血球への作用が比較的弱い塩化アンモニウム溶血剤などが推奨される。過剰な溶血処理は、白血球の破壊や喪失、非特異的蛍光の増大を招くため溶血の温度と時間は厳密に守る。特に、後述のように洗浄を実施しないため、機械の測定待ちの時間も考慮する。

＊洗浄に伴う細胞の喪失が測定結果に直接影響するため⁸⁾、洗浄を行わず測定する。

4) 測定・取り込み

CD34 陽性細胞取り込みおよび解析には専用のソフトウェアやメーカー作成の専用のテンプレートを使用することにより簡便かつ正確な解析が可能となる。

＜測定・取り込み手順例＞

1. 機器のセットアップ、精度管理などが終了していることを確認する。
2. CD34 陽性細胞取り込みおよび解析には専用のテンプレートを立ち上げる。
3. 患者名、検体名、測定日時などの検体情報を入力する。
4. サンプルパターンを確認するため、染色済みの検体を軽く vortex して、セットする。
5. 流速などを確認し、取り込みを開始する。
6. 検体毎に FSC/SSC プロットにて、細胞集団がすべてプロット内に収まっていることを確認する。必要に応じて FSC、SSC の voltage を調整する。

7. 内部標準粒子の種類によっては、粒子の径がリンパ球より小さい場合がある(BD® Stem Cell Enumeration Kit など)。この場合、Threshold を CD45-FITC で設定する必要があるため、FITC/SSC プロットにて、CD45dim の CD34 陽性細胞がカットされていないことを確認する。
 8. 保存細胞数を CD45 陽性細胞 75000 個以上、あるいは、CD34 陽性細胞 100 個以上と設定する。
 9. 設定後、データの取り込み保存を開始する。
- * プロセス管理用のコントロール検体がある場合は検体より先に測定・取り込みを行う。
 - * 時間軸を組み合わせたプロットを作成しておくこと、試料測定中の機器の状態も確認できる。

5) 解析

FSC、SSC、CD45 蛍光、CD34 蛍光を用いて、次の順序による階層化論理ゲーティング(logical gating)で CD34 陽性造血幹細胞を検出・同定する⁶⁾。

<解析手順例>

1. SSC/CD45 プロット上で、白血球集団(CD45 陽性細胞)をゲートする。下記テンプレート例の㉞
2. 白血球集団の SSC/CD34 プロット上で、CD34 陽性集団をゲートする。下記㉟
3. CD34 陽性細胞集団の SSC/CD45 プロット上で、SSC が低く CD45dim の集団をゲートする(CD45 強陽性集団を除外するため)。下記㊱
4. CD34 陽性 CD45dim 集団の SSC/FSC プロット上で、造血幹細胞集団を解析する(デブリや血小板凝集などを除外するため)。下記㊲

造血幹細胞の SSC/FSC プロット上の特徴は、「SSC は低く、FSC は低から中程度」である。SSC/CD45 プロット上でゲートしたリンパ球集団を SSC/FSC プロットで展開した集団(下記㊳)に一致する。

5. 死細胞検出用試薬(7-AAD)を用いる場合には、別に SSC/死細胞検出用試薬のプロットを作り、死細胞検出用試薬が陰性の集団全て(生細胞)、もしくは陽性の集団(死細胞)に解析領域ゲートを設定する。下記㊴

- * シングルプラットフォーム法でCD34陽性細胞数を直接測定する場合の設定は、使用する機器や試薬の組み合わせにより異なる。内部標準粒子の取扱説明書を参考にプロットとゲートを設定する。下記㊵
- * 全自動を含む自動解析ソフトを使用した場合でも必ずレビューを行い、ゲーティングが正しいか確認し、必要に応じてゲーティングを修正すること。機種に応じ、その方法をあらかじめ確認しておくこと。

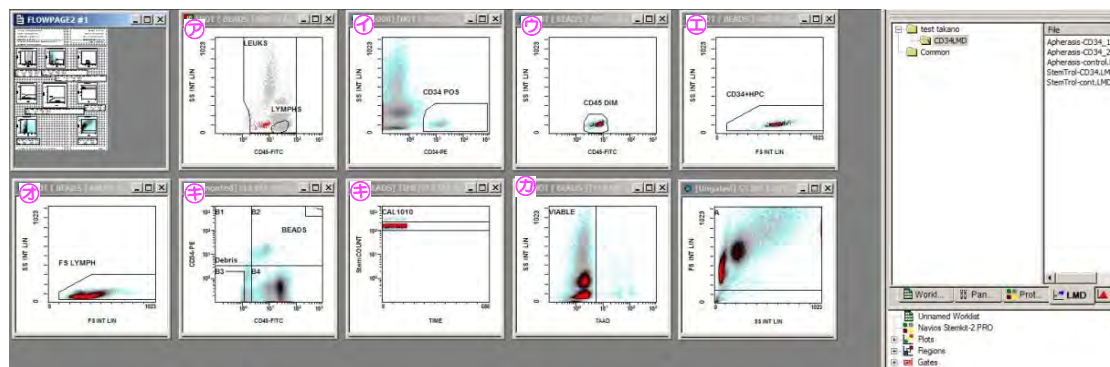
＜解析テンプレート例＞

キット; Stem-Kit

フローサイトメーター; Navios EX または Navios

ソフトウェア; Navios

測定パネル; Navios Stemkit.PNL など

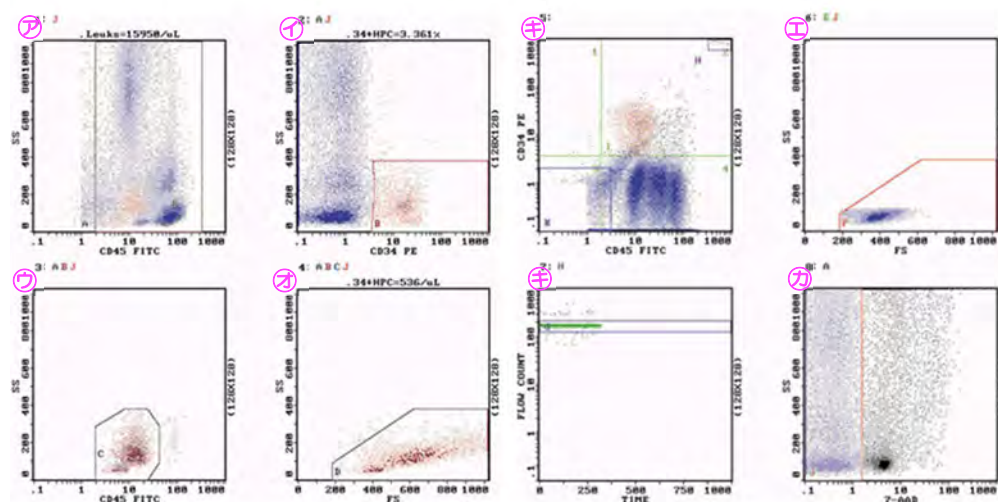


(Beckman Coulter. Stem-Kit 測定・解析マニュアル (Navios*版 Ver.1.2)から抜粋)

キット; Stem-Kit

フローサイトメーター; Cytomics FC500

ソフトウェア; stemCXP software



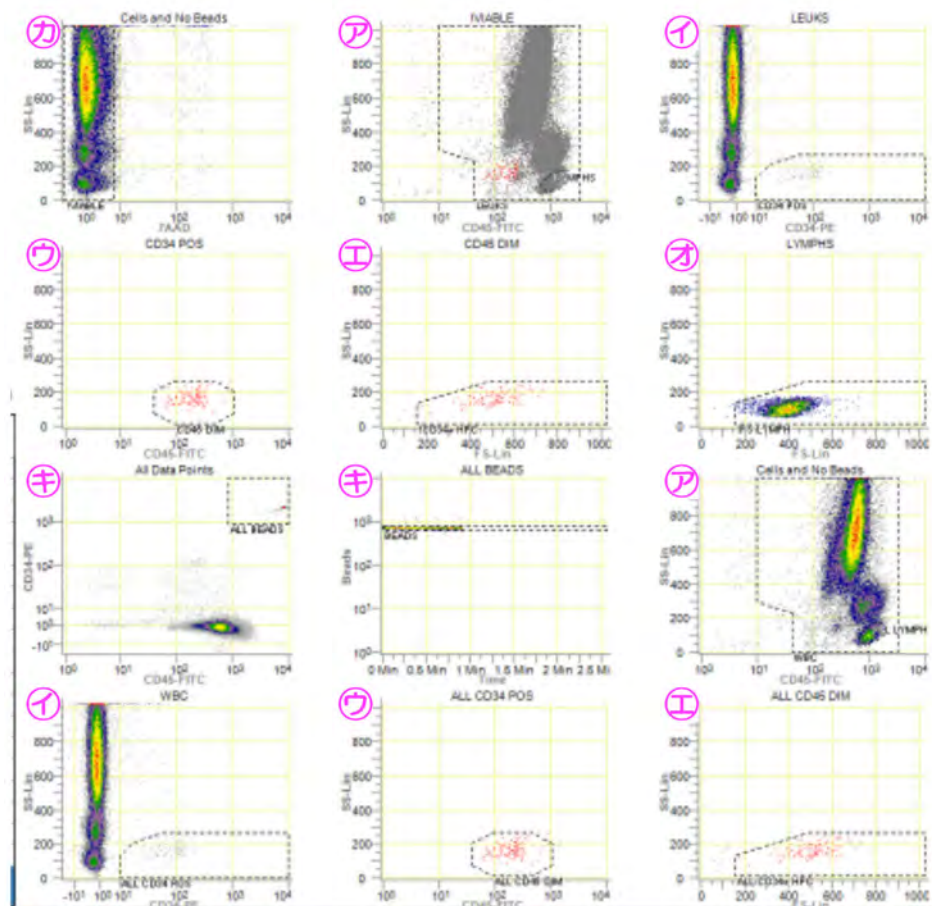
Stem-Kit 造血幹細胞数測定キット (beckman.jp) ホームページから抜粋

<https://www.beckman.jp/resources/techniques-and-methods/cytometrydotcom/reagent/stem-kit>

キット; AQUIOS STEM Kit

フローサイトメーター; AQUIOS

ソフトウェア; AQUIOS STEM Software

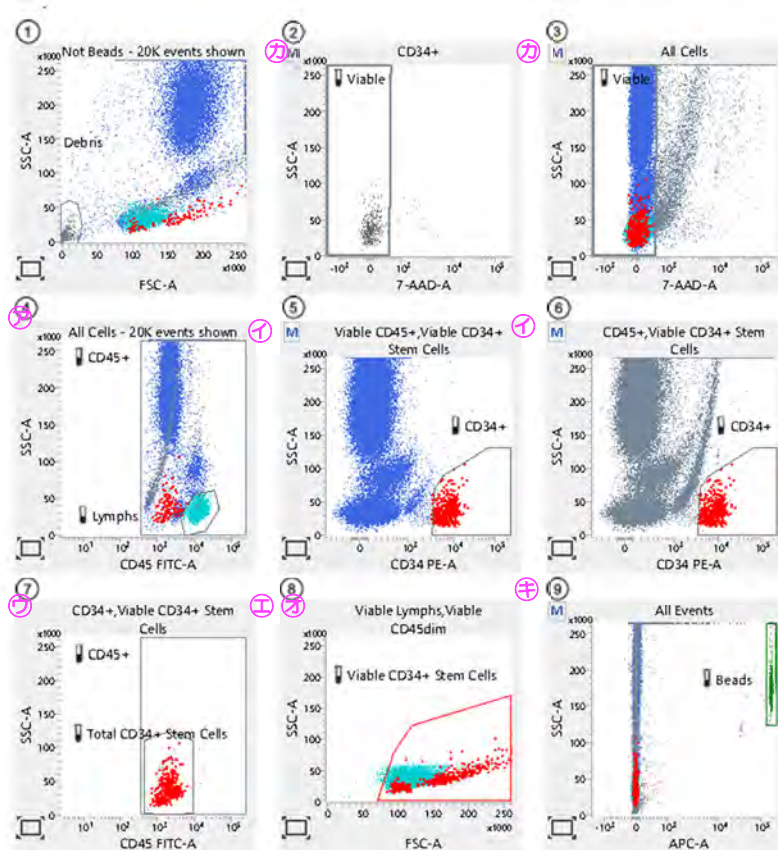


Beckman Coulter. AQUIOS CL TETRA&STEM トレーニング_ダイジェストマニュアル
Ver.1.0 AQUIOS STEM ソフトウェアシステムガイド から抜粋

キット; BD™ Stem Cell Enumeration Kit

フローサイトメーター; BD FACSLytic™

ソフトウェア; FACSuite™ Clinical ソフトウェア



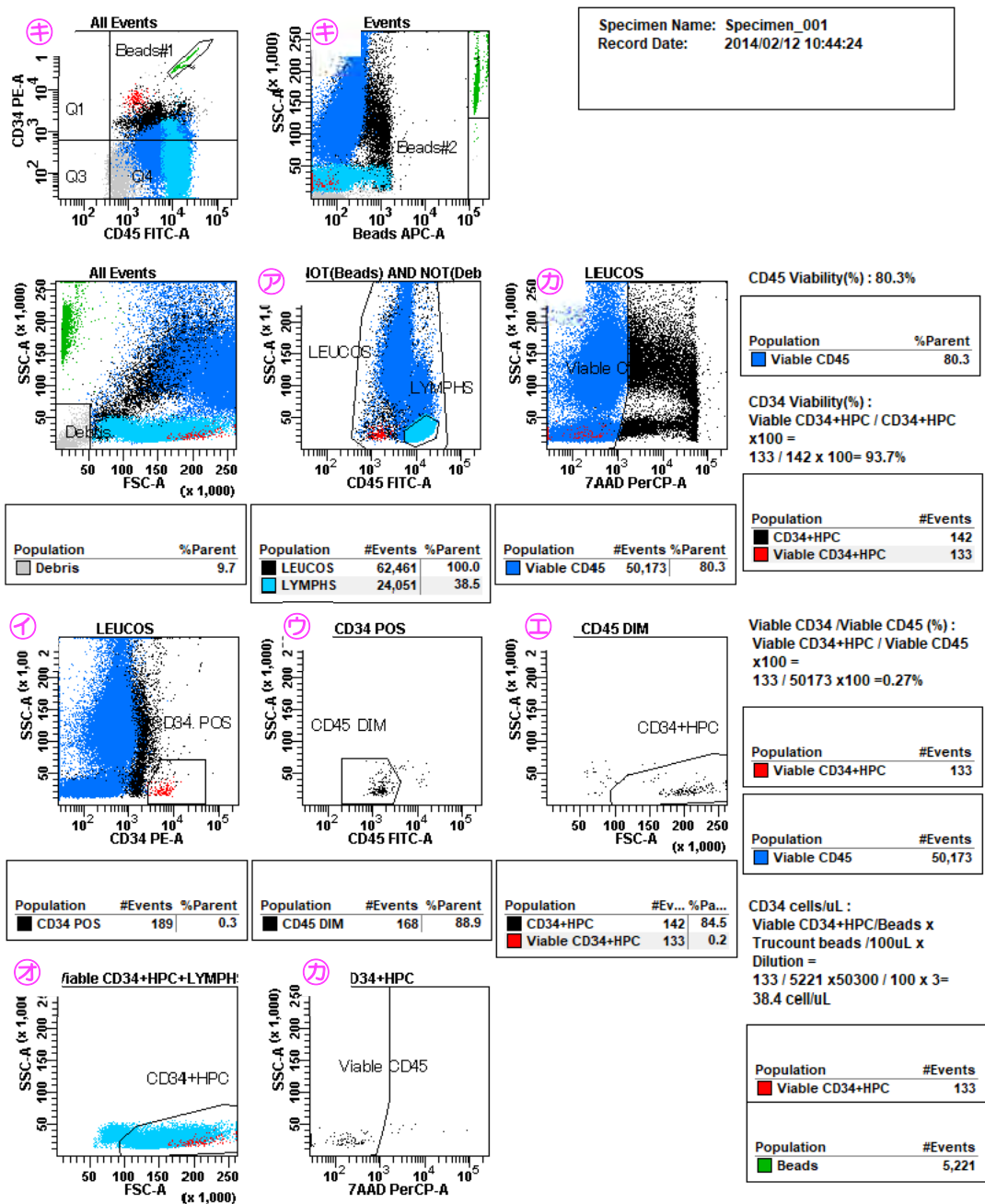
日本 BD 社 提供(「BD Stem Cell Enumeration Application Guide」より)

キット; BD™ Stem Cell Enumeration Kit

フローサイトメーター; BD FACSCanto II

ソフトウェア; BD FACSDiva™ソフトウェア(さい帯血バンク使用解析テンプレート)

(なお、BD FACSCanto II には、CD34 陽性細胞解析用の BD FACSCanto™ Clinical Software も存在する。ガイドライン⁶⁾参照のこと)



BD 社提供(解析 fcs ファイル;さい帯血バンクより提供)

6)結果

・シングルプラットフォーム法を用いた CD34 陽性細胞数算出

- 1.解析テンプレートから生 CD34 陽性細胞数、測定内部標準粒子測定数を抽出する。
- 2.添加検体量、希釈率、添加内部標準粒子添加数、総検体量を抽出する。

以下の式に当てはめて $1\mu\text{L}$ 中の CD34 陽性細胞絶対数を算出する。

$$\text{生 CD34 細胞濃度}[\mu\text{L}] = \frac{\text{生 CD34 陽性細胞数}[\text{個}]}{\text{測定内部標準粒子測定数}[\text{個}]} \times \frac{\text{添加内部標準粒子数}[\text{個}]}{\text{添加検体量}[\mu\text{L}]} \times \text{希釈倍率}[\text{倍}]$$

$$\text{生 CD34 陽性細胞数}[\text{個}] = \text{生 CD34 細胞濃度}[\mu\text{L}] \times \text{総検体量}[\text{mL}] \times 10^3$$

* 自動解析ソフトまたは専用のテンプレートを使用した場合は、内部標準粒子の量、検体量、希釈率、総検体量を入力すると、自動計算されるものもある。測定時および解析時に入力内容の確認が必要である。また、最終結果の参照場所も間違えぬこと。

データの評価

陽性コントロールの測定は、機種により必ずしも必須とされてはいないが、プロセスコントロールや機器の状態確認のために、実施できることが好ましい。

解析が自動であるか否かにかかわらず、データ確定の前に今一度ゲーティングが適切か確認することが重要である。必要に応じて拡大表示して確認する。

生の試料の測定であるから、CD34 陽性細胞集団が複数存在したり、分布が検体によって異なって見えることもある。さらに、階層化ゲーティングをしても、血小板凝集など非特異反応が混入する場合があるので、他のプロット図も参照し、ゲーティングを確認する。

検体を多重測定するか否かについては議論のあるところではあるが、ダブル測定をすることで 2 本目の測定終了までに時間を要する場合、溶血後未洗浄で測定するため検体の変化が起こりうることに留意する。2本目のプロット図が 1 本目と変化していないか、確認が必要である。また、多重測定の結果バラツキが認められた場合のデータの扱い方や再検基準はあらかじめ決めておく。

検体の攪拌不足や不正確なピペッティング、さらには、希釈の間違いなども起こりうる。これらの問題を検出するため、CD45 陽性領域の絶対数も算出し、自動血球分析装置の白血球数の値との一致を確認することが望ましい。

検査者間差の定期的な確認が必要なのは言うまでも無いことである。

精度管理と教育トレーニングの必要性

海外では 1990 年代より施設間差が注目され、外部制度評価が実施されてきた⁹⁾。一方、国内では自家末梢血幹細胞採取開始(1994 年承認)から非血縁者間末梢血幹細胞採取開

始(1 例目が 2011 年)まで、自施設内で採取と移植が完結していた期間が長く、施設間差に注目されることなく各施設独自の測定方法が定着していた。国内で外部精度評価が受けられる機会も無く、実際に大きな施設間差が存在した⁸⁾。2016 年と 17 年に日本輸血・細胞治療学会において国内初の全国規模で外部精度評価研究を実施し¹⁰⁾¹¹⁾、問題が認識されたと考えられる。その後は国内での商業ベースの外部精度管理が開始され、2018 年の医療法改正では検体検査の精度の確保が明記され、CD34 陽性細胞数測定についても定期的に外部精度評価を受ける施設が増え、飛躍的に標準化が進んだ¹²⁾。今後はこれを維持する段階に入ったが、標準化が先行した海外では、外部精度管理だけでなく、継続的な教育と技術的なサポートが必要と報告されている¹³⁾。現状では、日本骨髄バンクにおける末梢血幹細胞採取施設認定に CD34 陽性細胞測定の方法や精度に関する規定はない。加えて、CD34 陽性細胞数測定単独での保険算定もないため施設によっては外部精度管理の予算配分がなされにくく、標準化を維持するには各検査室の努力に負うところが大きい。このため輸血・細胞治療学会では定期的な教育の機会と術総会時に「フローサイトメリーによる CD34 陽性細胞数測定研修セミナー」を実施している。外部精度管理受審と合わせ活用いただきたいと考える。

参考文献

- 1) Hequet O. Hematopoietic stem and progenitor cell harvesting: technical advances and clinical utility. J Blood Med. 2015;6:55-67.
- 2) 血細胞移植学会ガイドライン第 2 巻 同種末梢血幹細胞移植のための健常人ドナーからの末梢血幹細胞動員・採取 第 5 版.
(https://www.jstct.or.jp/uploads/files/guideline/08m_pbsc_harvest.pdf)
- 3) 上田恭典. 厚生労働省科学研究費補助金 平成 31 年度/令和元年度 分担研究報告書、非血縁者間末梢血幹細胞移植における末梢血幹細胞の効率的提供と至適な利用率増加に繋がる実践的支援体制の整備. ドナーコーディネートと非血縁末梢血幹細胞採取の効率化.
(https://mhlw-grants.niph.go.jp/system/files/2019/192081/201914001A_upload/201914001A0006.pdf)
- 4) Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, et al. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother. 1996;3:213-226.
- 5) Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, et al. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. Cytometry. 1998;34:61-70.
- 6) 日本臨床検査標準協議会 血液検査標準化検討委員会 フローサイトメリーワーキンググループ. フローサイトメリーによる CD34 陽性細胞検出に関するガイドライン

(JCCLS H3-A V2.0)

(http://yuketsu.jstmct.or.jp/wp-content/uploads/2017/10/Guidelines_for_CD34aV2.pdf)

7) 一般社団法人日本造血・免疫細胞療学会. 造血細胞移植ガイドラインー造血幹細胞採取(第2版). 2022年5月

(https://www.jstct.or.jp/uploads/files/guideline/02_03_harvest02.pdf)

8) 原口京子、奥山美樹、田野崎隆二、國友由紀子、吉田茂久、上村知恵、府川正儀、伊藤みゆき、森毅彦、大橋一輝、谷口修一、牧野茂義、高梨美乃子、坂巻壽. CD34 陽性細胞測定における施設間差の検討. 輸血細胞治療学会誌. 2016; 62: 32-40.

9) Barnett D, Granger I, Storie J, et al. Quality assessment of CD34+ stem cell enumeration: experience of the United Kingdom National External Quality Assessment Scheme (UK NEQAS) using a unique stable whole blood preparation. Br J Hematol. 1998;102:553-565.

10) 原口京子、奥山美樹、高橋典子、河原好絵、酒井紫緒、上村知恵、渡邊直英、長村一井上登紀子、高梨美乃子、上田恭典、田野崎隆二、日本輸血・細胞治療学会細胞治療委員会 CD34 陽性細胞研究グループ. 固定血球を用いた CD34 陽性細胞数測定の外部評価に関する全国他施設共同研究. 輸血細胞治療学会誌. 2017; 63: 126-134.

11) 原口京子、奥山美樹、高橋典子、高杉淑子、宮本京子、上村知恵、金子誠、池田和彦、渡邊直英、長村登紀子、高梨美乃子、上田恭典、田野崎隆二. 国内における CD34 陽性細胞数測定の外部評価に関する他施設共同研究(会議録) 第40回日本造血細胞移植学会総会. 2018; 207

12) 原口京子、高橋敦子、奥山美樹、高橋典子、宮本京子、李悦子、高杉淑子、金子誠、池田和彦、石丸文彦、高梨美乃子、上田恭典、長村(井上)登紀子、田野崎隆二、日本輸血・細胞治療学会細胞治療合同委員会造血幹細胞移植関連委員会造血細胞検査ワーキンググループ. 非血縁者間末梢血幹細胞移植における採取施設と移植施設の CD34 測定値に関する実態調査. 日本輸血細胞治療学会誌 2024; 70: 431-439.

13) Whitby A, Whitby L, Fletcher M, et al. ISHAGE protocol: Are we doing it correctly? Cytometry Part B 2012;82B:9-17.

(執筆者:原口京子、高橋敦子、査読者:新井康之)

第4.4章 コロニーアッセイ法

はじめに

採取した細胞に含まれる造血幹細胞の評価方法としては、一般には CD34 陽性細胞数の測定(Flow Cytometry)と共に colony assay がある。CD34 陽性細胞 = コロニー形成細胞とは限らないが、正の相関関係にある。前者は造血幹細胞の表面マーカーを横断的に観察するものであり、後者は造血前駆細胞の造血能を増殖・分化という観点から時間的に観察するものである。原理は、造血幹細胞を含んだ血液細胞に造血因子を加えて Methylcellulose(半流動培地)で培養すると、その中の造血前駆細胞は増殖・分化して細胞集塊を形成する。この細胞集塊をコロニーといい、この形態形状を観察するものである。

一つのコロニーは1個の造血前駆細胞由来の細胞集団であり、一般的には20個以上の場合をコロニーといい、それ以下を cluster と呼ぶ。コロニーの色、形、構成している細胞形態からそのもとに由来する前駆細胞を同定することができる。Methylcellulose を用いて Interleukin-3 (IL-3), Erythropoietin (EPO), その他 Stem Cell Factor (SCF), Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF), Granulocyte macrophage CSF (GM-CSF)等の cytokine を加え、37℃、5%CO₂、湿度 100%の条件下のインキュベータ内で、14 日間培養する。これにより形成されるコロニー前駆細胞には顆粒球・マクロファージコロニー形成細胞(colony forming unit-granulocyte/macrophage : CFU-GM), 赤芽球バーストコロニー形成細胞(burst forming unit-erythrocyte : BFU-E), 混合コロニー形成細胞(CFU-GEoMM/CFU-Mix)等がある。CFU-Mix は、CFU-GM/G BFU-E を内包し、骨髓系、赤血球系への分化能を呈しているので、この中では最も造血幹細胞に近い細胞を反映していると考えられる。本来は巨核球も含まれるべきであるが、CFU-megakaryocyte (CFU-Meg)は、Thrombopoietin (TPO)存在下の特殊な培養法でのみ観察でき、区別には熟練を要する。しかし、CFU-Mix は数が少なく、測定者間のばらつきが大きいため、CFU-GM 数のみを提示する場合も多い。CFU-GM(+CFU-Mix)数は、CD34 陽性細胞数と高い相関性があり、造血幹細胞中に何個の前駆細胞が含まれているか、実数として表示ができる。CFU-Mix の段階から骨髓系に分化したコロニーが CFU-GM であり、顆粒球(好中球)とマクロファージからなる。さらに分化すると、CFU-G または CFU-M として観察され、各々マクロファージと顆粒球のみから形成される。赤血球系に commit した造血前駆細胞 BFU-E は赤芽球バースト及び CFU-E(colony forming unit-erythroid)赤血球コロニーとして観察される。

なお、培養に加える cytokine は、新たな cytokine の発見等により、年代や施設によって異なる。造血幹細胞移植施設によっては長い歴史の中での一貫して、同一の cytokine を用いて検討している場合もあるが、近年他施設間では市販培地の統一傾向にある。いずれにしても施設では指針を明瞭にし、変更の際には事前検討を行う必要がある。

Colony assay 用の細胞処理等はクリーンベンチ、安全キャビネット内で無菌操作を行うた

め、操作に慣れないとカビのコロニーが形成される。均等に播種しないと結果が出せないことがある。またコロニーの種類や形態を熟知していないと同定できず、カウントにバラツキが生じるため、慣れるまでは経験者と目合わせ等の教育を受けて経験を積み、施設内で統一しておくことが大切である。

適応

- 1) 末梢血幹細胞移植・骨髄移植・臍帯血移植(解凍後)時の輸注移植細胞の評価
- 2) 細胞処理後の評価
- 3) 凍結保存サンプルの評価

必要物品

品名	個数
単核球分離 ① 骨髄液 ② 15mL Conical Tube ③ 比重液 (1.077/Ficoll または Lymphoprep) ④ ピペット (1mL, 2mL, 5mL, 10mL) およびピペッター ⑤ PBS ⑥ 血球計算盤 (Burker-Türk)、Turk's Solution または Trypan Blue Solution.	
Methylcellulose 培地: MethoCult H4034 (Stemcell Technologies Inc./ベリタス社) 組成: methylcellulose in Iscove's MDM, fetal bovine serum, bovine serum albumin, 2-mercaptoethanol, L-glutamine, rhSCF, rhGM-CSF, rhIL-3, rh-erythropoietin,	必要本数を予め分注して凍結保存。
滅菌蒸留水	2mL/35mm dish
15mL Conical Tube	2-3 本
1mL シリンジ	1
18G 注射針 (または専用の鈍角針)	1
100mm Culture Dish	1
35mm Petri Dish (* Tissue Culture 用は細胞が底に付着するので不適)	3 dishes
プラスチック手袋 (検体を取り扱う際には常に着用のこと)	1
クリーンベンチ	1
CO ₂ インキュベータ, 安全キャビネット	1
倒立顕微鏡	1
チップ (P10/P20/P200/P1000) およびピペットマン	1
60mm グリッド付き Culture Dish (グリッド付きスライドガラス等も可) 必要に応じて	1
Vortex Mixer 必要に応じて	1

表 1 必要物品一覧

手順

(1)細胞の調製

播種する細胞数の決定は、造血幹細胞の評価系である Colony assay 法においては、作業者による誤差を最低限にし、正しく計数するために重要である。播種細胞数が極端に多い場合、個々のコロニーが判別出来ずカウント出来ないだけでなくコロニー形成が阻害され、結果として colony size や数が負に影響される。逆に極端に少ないと CFU-Mix colony 等の少数集団のコロニーがゼロとなったりして、過小評価となる。

また、播種する細胞数はどのような状態時に採取されたか、例えば G-CSF 投与の状態ではその時の CD34 陽性の細胞数等によって調節する必要がある(表1参照)。必要に応じて骨髓液は、比重遠心法により単核球分離して播種する。血液型異型のための単核球分離後の骨髓または末梢血幹細胞採取後では特に単核球分離は不要であり、細胞濃度のみの調製で播種可能である。

1. 骨髓は細胞濃度が高いため buffer で 2～3 倍に希釈する。
2. Ficoll (比重 1.077)室温 4mL を、15mL の Conical Tube に入れる。①で調製した骨髓液:比重液量比が 1～2:1 になるように静かに Ficoll 上に重層する(Ficoll-Hypaque 法) (図 1A)。
注) 骨髓液を重層する際は、血液層を乱さないように慎重に行う。層が乱れると単核球の回収率は低下する。
3. 室温で 530g (1800rpm) 20min 遠心分離する(図 1B)。
注) スウィングローターを使用してブレーキ OFF を推奨することで遠心後、各層の乱れ防止になる。
4. 単核球層を採取し、充分量の PBS を加えて良く攪拌し、370g(1500rpm)10min 遠心後、上清を除去する(洗浄操作) (図 1C,D)。
5. この操作を 2 回行う。
6. 細胞に Medium (α MEM 等)を加えて細胞数を算定する。

表 2 を参考にしながら細胞数を希釈調節する(図 1 E,F)。

検体	Methylcellulose 培地 1mL 当りの細胞数
骨髓(単核球)	$2\sim5 \times 10^4$ cells/mL
末梢血幹細胞	$2\sim20 \times 10^4$ cells/mL (※CD34 ⁺ 値を参考にしながら調製)
CD34 陽性細胞	200～500 cells/mL
臍帯血(単核球として)	$1\sim2 \times 10^4$ cells/mL
臍帯血(解凍サンプル)	$2\sim5 \mu$ L/mL

表2 Methylcellulose 培地 1mL 当りの播種細胞数の目安

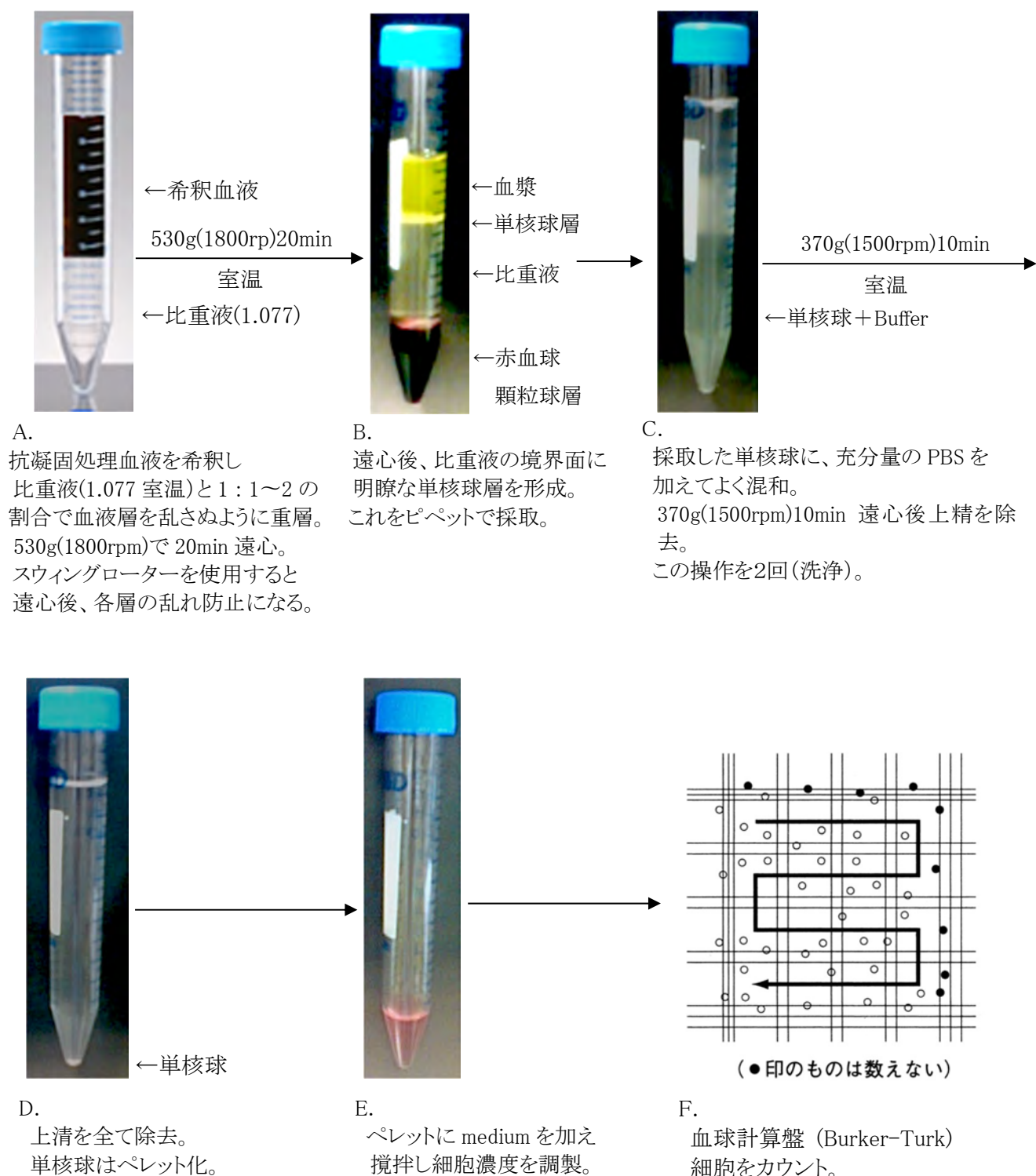


図1 単核球分離

(2) Methylcellulose 培地の調製

1. 構成する Methylcellulose 培地には α MEM と IMDM が一般的で、いずれも既製品が市販されている。Methylcellulose 培地は -20°C で保管し、凍結解凍の繰り返しは避ける。一回に使用する量(下記の cytokine も含めて)を、予めチューブに分注して凍結しておくが便利である。
2. Methylcellulose を冷蔵または室温で解凍する。
3. Methylcellulose (終濃度 0.9~1.2%)に、牛胎児血清 (fetal bovine serum; FBS、終濃度 30%)、牛血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA、終濃度 1%)、2-mercaptoethanol (2-ME、終濃度 $5 \times 10^{-5}\text{M}$)、L-glutamine、IL-3 (終濃度 10ng/mL)、EPO (2U/mL)、その他 stem cell factor (SCF、終濃度 10ng/mL)、G-CSF (終濃度 10ng/mL)、GM-CSF (終濃度 10ng/mL) などを加える。どの cytokine を加えるかは予め検討しておく。多くの臍帯血バンク等で使用している Methylcellulose 培地: MethoCult H4034 (Stemcell Technologies Inc. Vancouver, BC, Canada) は、既に cytokine や試薬等が含まれ FBS の Lot 評価もされているため細胞浮遊液のみ、添加で播種できる。

(3) 播種

1. Methylcellulose 4mL に、(1)で調製した細胞浮遊液の容量 0.4mL (図2A)を添加する。これにより 3 dish (半流動培地のため) 分の培地が得られる。ただし、添加する容量は市販の Methylcellulose 培地の種類によって異なるので添付書を参考にする。
2. 細胞浮遊液を加えた後、チューブの蓋をしっかり締めて上下に 30 回位、勢いよく振盪しながら混ぜて細胞が均等に混じり合うようにする。Vortex でも可能 (図2B)。
3. チューブを立て 5 分間位放置し、脱気する。
4. 35mm Petri dish または収容する 100mm dish の蓋の上または側面に日付や検体内容を記入する。
5. 1mL のシリンジに 18G の針をつけ、チューブの淵にシリンジが当たらないように中心に針を沈めて Methylcellulose を 2~3 回シリンジで引きながら、シリンジ内の空気を抜く (図 2C)。
6. 35mm dish 1 枚に 1.1mL を分注し dish を傾けながら回転させ、Methylcellulose 培地を均一に広げる。大きな気泡は潰しておく (図2D)。
7. 100mm dish には、35 mm の Methylcellulose 培地入り dish 2 枚に蓋をし、もう 1 枚の 35mm dish には滅菌水 2mL を入れて、蓋はしない (Methylcellulose 培地の乾燥を防ぐため) で入れる。そして 100mm dish に蓋をする (図2E)。
8. dish ごと、 37°C 、5% CO_2 、湿度 100% の安定したインキュベータに入れる。培養は 14 日間であるが、この間はあまり出し入れをしない。またインキュベータが揺れないよう注意をする。ひとつのコロニーが崩れて 2 つに見える。

(4)コロニーカウント

1. 培養14日目、インキュベータからdishを取り出し、倒立顕微鏡のグリッド付き scoring dish (60mm の格子入り培養ディッシュ)をホルダー上に固定し、メカニカルステージのX軸ハンドル及びY軸ハンドルを操作しながら最初は低倍率(2.5 倍)で dish の全視野を走査し、拡大率 40～50 倍(接眼レンズ 10 倍、対物レンズ 4～5 倍)で各コロニー形成細胞を確認しながらコロニーの数をカウントする。必要に応じて、さらに高倍率でコロニーの種類を確認する(図 2F)。
2. 検査結果を表に記載する(図 3)。

※Methylcellulose は粘度の高い液体のため、培養中およびコロニー観察中は液面を乱さないよう水平を保ちながら丁寧に扱うようにする。培養14日目前後でコロニー数の変動がみられない範囲を決定しておく。

検 体	骨髄移植	末梢血幹細胞移植	臍帯血移植
CFU-GM 数	$\geq 1 \sim 2 \times 10^5 / \text{kg}$	$\geq 1 \sim 2 \times 10^5 / \text{kg}$	$\geq 5 \times 10^4 / \text{kg}$

表3 各種造血幹細胞移植に必要とする CFU-GM 数(理想的)

これらの造血幹細胞移植に必要な CFU-GM 数を輸注することで、造血機能の回復が得られているので臨床では前駆細胞レベルの細胞数により左右されていると考えられる。



A.
細胞濃度を調製。



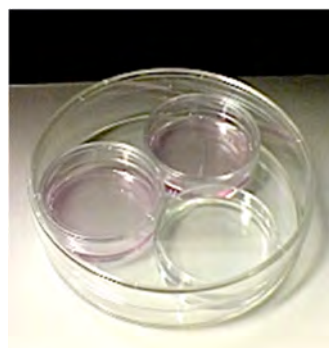
B.
必要細胞数を加え、蓋をして上下に 30 回位激しく振る。静置して脱気する。



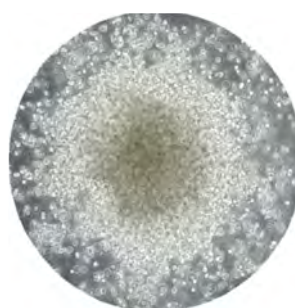
C.
管壁に触れ無いうように 2～3 回シリンジを引き、正確に 1.1mL を採取する。



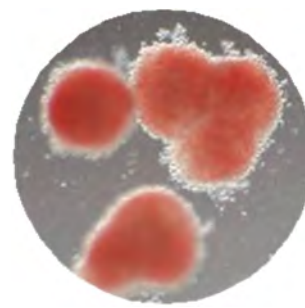
D.
35mm dish に注入する。dish を傾けながら隅々まで均一に播く。(蓋をする)



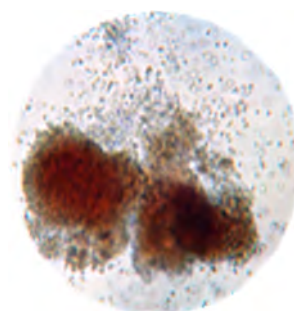
E.
100mm dish にセットし蓋をする。乾燥防止のため必ず 35mm dish 1個に滅菌水を 2mL 入れる。(蓋はしない)



CFU-GM



BFU-E



CFU-Mix

F.
加湿インキュベータにて 37℃、5% CO₂ 下で 14 日間インキュベート後、カウントする。

図2 コロニーアッセイ

コロニーアッセイ申込書(兼報告書)

申込日 ○○○○年 ○○ 月○○日 (採血日 ○○○○年 ○○ 月○○日)

患者名 ○○○○ ○○歳 血液型 (A) 型 Rh (+)	検体名 骨髓・末梢血・末梢血幹細胞 その他 (u-BMT)
疾患名 ○○○○	連絡事項 Donorの血液型 (B) 型Rh (+) G-CSF 投与 (-)
申込医 ○○○○	移植日 ○○○○年 ○○ 月○○日
病棟名 ○F 病棟	細胞数 2.62×10^9 個

回収細胞数 サンプル 1100 ml より NC (Nucleated cells)
有核細胞数 $\approx 19.55 \times 10^9$
MNC (Mononuclear Cells)
単核球数 $= 2.62 \times 10^9$ 個回収

cell no	dish no	GM	BFU-E	E-Mix	Total
$2.0 \times 10^4/\text{ml}$	1	67	92	35	199
	2	60	86	32	180
	3	72	95	40	215
	4	63	81	37	186
	mean $\pm$ SD	65.50 $\pm$ 5.20	88.50 $\pm$ 6.24	36.00 $\pm$ 3.37	195.00 $\pm$ 15.51

※ GM + E-mix = 101.5

$$\frac{101.5 \times 2.62 \times 10^9}{2.0 \times 10^4} = 1.33 \times 10^7$$

※ 各施設でGMコロニーの選択基準をとり決めておく。

例1: GM(必須)のみ

例2: GM(必須) + E-Mix

GM-Containing Progenitor

サンプル 1100mlより 1.33×10^7 個 (total)

BW : 60kg

$$\frac{1.33 \times 10^7}{60} = 2.22 \times 10^5/\text{kg}$$

コメント

報告日 ○○○○年 ○○ 月○○日

○○○○大学○○○○附属病院

○○○○・輸血部 印

図3 コロニーアッセイ申込書(兼報告書)

参考文献

- 1) Eaves C and Lambie K, Atlas of Human Hematopoietic Colonies. StemCell Technologies Inc., 1995.
- 2) 中畑龍俊、池淵研二. メチルセルロース培地を用いた造血細胞のコロニーアッセイ. ベリタス株式会社
- 3) 小野寺良尚、齋藤英彦監修. 造血細胞移植マニュアル、第3版改訂新版第2刷、医学書院、2005.
- 4) 東大医科研 輸血部手順書

(執筆:長村登紀子、尾上和夫、査読:岸野光司)

第4.5章 リンパ球採取

はじめに

アフエレーシスによるリンパ球(T細胞)採取は、ドナーリンパ球輸注(DLI)療法や、CAR-T細胞療法の「原料」確保のための第一歩となる。これらで採取すべき細胞は同じであるが、健常人であるドナーからのリンパ球を目的として採取(DLI)するのと、化学療法を繰り返した難治性造血器腫瘍患者から対象に採取(CAR-T)するのでは、留意点が異なる。いずれにせよドナー背景に応じてアフエレーシス計画を最適化する必要があり、細胞取り扱いの観点から概説する。

ドナーリンパ球輸注

DLIは、造血幹細胞移植後の再発や、移植後EBウイルスによるBリンパ球増殖性疾患に対して、移植を行った同じドナーから得られたリンパ球を投与する治療法である。DLIで使用されるドナーリンパ球の採取方法としては、少量の場合は全血採血、比較的多くのリンパ球数が必要な場合はアフエレーシスを用いる。凍結による分割投与も可能である。より詳しい適応や効果は、日本造血・免疫細胞療法学会より発行されている「造血幹細胞採取ガイドライン」(ドナーリンパ球輸注)を参照するとよい。

ドナーリンパ球の採取に当たっては、改めて提供意思を確認した上で、骨髓採取や末梢血幹細胞採取と同様に、ドナー検診を行う。血算、生化学、感染症、凝固系、電解質、心電図、検尿など一通り異常が無い場合に限り、適格と判断する。採取量は、全血の場合は最大400mLまで、アフエレーシスの場合には、処理血液総量でドナー体重1kgあたり100mLを上限と定めている。

採取に当たっては、バッグに適切なラベリングを行い、取り違いなどが起こらないように十分注意する。骨髓バンクを介したDLIの場合には、所定のラベルを貼付する(その場合、個人情報を書かれた院内ラベルは除去する必要がある)。採取後は、骨髓バンクの場合、採取施設側に速やかに引き渡す。血縁ドナーの場合には、院内で投与準備として検体採取(細胞数カウント)、分注・凍結などの細胞処理が進む。その際は、段階的に細胞数を増やしながら複数回に分けて投与することを見越して、CD3陽性細胞数の総数と患者体重をもとに、内容量の異なる複数バッグに分注して凍結する。そのため、枝番を含めたバッグのラベル発行記録、ラベリング作業には、取り違いが起こらないよう十分に留意する。

一般的に、当日中の処理が可能であれば、冷蔵保存は不要であるが、処理が翌日になる場合には、2-8℃で保管する必要がある。

CAR-T細胞療法その他

CAR-T細胞療法用のリンパ球採取は各メーカーが要求する基本的な手順に、各施設で

実情に合った修正を加えることで作成された標準作業手順書(SOP)と記録書に基づいて施行される。CAR-T 細胞療法を施行するためには、予め各製薬メーカーの施設認証を受ける必要があり、その際には造血細胞治療製品のための採取、調製、投与に関する国際基準 (FACT-JACIE 基準) に基づいた SOP や記録書を整備する必要がある。認定施設は、設備・体制の監査を受けているため、一定のレベルが担保されていると考えて良い。以下、実際の運用を顧みながら、いくつかのピットフォールを記載する。

細胞採取の環境については、アフェレーシスの項目に書かれているとおり、微生物汚染のリスクを最小限に考えた、清潔な専用エリアが望ましい。実際の日常診療において、このような環境を厳密に守ることは困難であるが、他のアフェレーシス(末梢血幹細胞や、DLI)と違い、CAR-T の場合は得られた細胞の拡大培養という工程が含まれているため、無菌性の担保がより高度に求められることに留意する。採取バッグ内へのコンタミは、血管穿刺部位からの皮膚常在菌混入のリスクが最も高いと考えられるため、穿刺時の皮膚消毒は入念に行うことはもちろんのこと、採取ベッド付近の環境整備・清掃も重要である。

また同時に、患者の急変や災害時に備え、救急カートを常備し、緊急時の人員確保手段および救急サービス利用手順を確認しておく必要がある。

採取に関わる人員には、各メーカーが作成するトレーニングを完了することが求められる。このトレーニングは、各責任者に FACT が要求する教育研修の一部と見なせるため、関係するメンバー全員が一度はトレーニングを受け、定期的にアップデートすることが望ましく、トレーニング記録の作成が重要である。

リンパ球採取に関する SOP は、本質的には各製品とも同じであるが、施設間あるいは製品間でわずかな差が生じる。採取回路プライミングは、通常は生理食塩水で行うが、体重が 25kg 未満の症例や、貧血を認める症例では、輸血製剤である赤血球濃厚液(RBC)で行うこともある。前者は、回路ボリュームによる貧血を予防するため、後者は、貧血によるインターフェイス形成不良が原因の採取効率の低下 (Jo T, et al. Transplant Cell Ther. 2022;28:365.e1-7.)を防ぐためである。

リンパ球採取の際には、安定した血流を維持するための血管を確保することが最も重要である。特に CAR-T 療法のためのリンパ球採取では、リンパ球数が $100/\mu\text{L}$ 前後の症例から採取することもあり、この場合処理血液量が 12-15L 程度となる。確実に 1 日で採取を終了するため、慶應義塾大学病院や京都大学病院では、全症例で事前に大腿静脈への透析用ダブルまたはトリプルルーメンカテーテルを挿入し採取を実施している。血液処理量は患者の末梢血中リンパ球数あるいは CD3 陽性リンパ球数により規定されるのが一般的である。必要とされる血液処理量は、製剤メーカーにより規定が異なるため、SOP に従い間違いのないように採取を計画する必要がある。中間産物のカウント(サンプルポートを用いてアフェレーシス中に検体を無菌的に採取する)を行うことで、アフェレーシス完了までの血液処理量を微調整することも可能であり、各施設で症例毎に入念に計画を立てることが重要であろう。

自己血漿の採取要否は、製剤によって異なる。血漿取り忘れのインシデントも一定の割合で発生しうるため、アフエレーシス開始前にタイムアウトを行うか、あるいは、指示票を作るなどして全員の認識を一致させる必要がある。なお血漿採取は、アフエレーシス終了時ではなく、アフエレーシス開始直後に行う方が、取り忘れのリスク軽減につながるだろう。

採取バッグへのラベル貼付は、メーカー毎にラベルの種類や推奨されている貼付のタイミングが異なっている。個別対応はミスのもとになるため、なるべくは院内のルールに合わせる(そしてメーカーの要求にも応える)形で、SOPを工夫したい(FACT-JACIE 基準 C7.4.2)。京都大学病院や慶應義塾大学病院では、すべてのアフエレーシスにおいて、「アフエレーシス ID 付きラベル」を発行する運用になっており、CAR-T アフエレーシスの際も、まずはそのラベルを貼付した後、メーカー指定のラベルを貼る運用としている。

採取された細胞は、所定の搬送容器に移され、そのままメーカーに引き渡されるか、院内の細胞調製施設で凍結作業を行う。一時的に院内で保管する場合には、予め決められた手順に従い、外部関係者の目に触れない場所を選択している。

これら SOP に即して行った行為の記録は、記録書に細かく記載する。採取工程や採取産物の詳細については、製薬メーカー固有のシステムを介して、原料情報として提供が必要になる。また、メーカーの運搬担当者に手渡すまでに、複数のメンバーの手を経ることから、Chain of custody もしっかり記録をしておくことが重要であろう。これらの記録は最低 10 年間の記録が推奨されており、基本的には電子カルテ内に記録をファイリングするのが望ましい。

(執筆者:山崎理絵、新井康之、査読者:高梨美乃子)

第4.6章 輸血に用いる顆粒球の取り扱い

はじめに

顆粒球輸血療法 (granulocyte transfusion therapy: GTX) は好中球減少時の難治性感染症の治療法として、1970年代に盛んに行われたが、効果が不明確であったことや抗生剤、抗真菌剤の進歩、顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte-colony stimulating factor: G-CSF) の登場等により 1980年代には急速に行われなくなった。

その後、G-CSF を用いることによって大量の顆粒球採取が可能となり、顆粒球輸血の有効性を示唆する少数例の検討が多数報告されるようになった。顆粒球輸血の有効性を検証する第III相試験は、不十分な症例登録数等の理由によりの有効性を証明するに至らず¹⁾、また、抗生剤、抗真菌剤の進歩は続いている。一方で、現在も好中球減少時の感染症が致命的となり得ることは事実であり、これを背景として一部の施設では顆粒球輸血が行われている²⁾。顆粒球輸血は、保険承認された治療ではないため、施設の倫理委員会における承認などに基づいて行われるべき治療であることに留意されたい。

GTX の適応

GTX は、抗生剤、抗真菌剤抵抗性の感染症の治療を目的に施行されるものである。2021年に公表された英国 NHS による GTX のガイドライン³⁾を参考に、GTX の適応につき下記に述べる。

GTX の適応となり得る症例

- 重度の好中球減少 (好中球 $< 500/\mu\text{L}$) があること
- 寛解を目指した治療を行っていること
- 証明されている (proven) か臨床的に診断されている (highly probable) 真菌または細菌感染を有し、これらが抗生剤、抗真菌薬に抵抗性であること
- 数週間以内での好中球の回復が見込まれること

GTX の適応とすべきでない症例

- 将来的に好中球回復が期待できないあるいは積極的な治療が予定されていない
- 好中球減少または好中球機能異常を合併していない敗血症
- 不明熱
- ウイルス感染単独 (真菌または細菌感染を合併していない)

上記を満たす症例の多くは、急性白血病の寛解導入中、あるいは白血病を含む造血器腫瘍に対する造血幹細胞移植を行っている症例である。一方で、先天性好中球機能異常症については、治療抵抗性の真菌または細菌感染に対し、好中球数に関わらず GTX の適応となる可能性がある⁴⁾。

好中球減少期における感染症の予防として GTX を行うことについては十分なデータが無

く⁵⁾、推奨されない。

ドナーの選択

海外では非血縁ドナーからの顆粒球採取も行われているが、本邦において GTX は各施設の倫理委員会の承認等に基づいて行われ、顆粒球ドナーは患者の血縁者が望ましい^{6),7)}。ドナーの適格性判断は、同種末梢血幹細胞ドナー適格性基準⁸⁾に準じて行い、一人のドナーからの顆粒球採取回数は、アフエレーシス法の場合、骨髄バンクに準じ、原則2回までとし、それ以上の場合は施設内で協議されることが望ましい。バッグ法の場合、一回に処理する血液量は最大800mL で、約80%は返血されるので循環動態に与える影響は少ないと判断される。この点を考慮しドナーに過度の負担がかからない範囲とする。また、返血にあたっては輸血療法の実施に関する指針⁹⁾の「院内で輸血用血液を採取する場合（自己血採血を除く）」に準じて実施する。

顆粒球製剤には、一定量のドナー由来赤血球、血漿が混入することから、原則として患者と同型の血液型ドナー（ABO 型、RhD 型）とする。やむを得ない場合は ABO 血液型副不適合(minor incompatibility)ドナーからの採取も選択される。その場合、混入する血漿の影響を考慮する必要がある、臨床的に許容範囲内ではない場合は、血漿除去が必要となる。

顆粒球採取

(1) 顆粒球の動員

顆粒球の動員には、G-CSF（本邦では顆粒球ドナーに対する G-CSF の保険適応はない）は不可欠であり、G-CSF 単独、あるいはこれにデキサメタゾンを併用して行われる。両者を併用することにより、より多くの顆粒球を動員することが可能である。一般に顆粒球採取の12～18時間前に G-CSF 5～10 μ g/kg を単回皮下注射する。デキサメタゾンを併用する場合には 8 mg を G-CSF 投与と同時期に服用する¹⁾。

(2) 顆粒球採取法

顆粒球採取法には血液成分採取装置を用いる“アフエレーシス法”と輸血バッグに採取した全血から遠心分離する“バッグ法”とがある。

1) アフエレーシス法

遠心型血液成分採取装置であれば、いずれの機種でも可能である。アフエレーシスドナーを選定する場合には通常ドナー検査（後述）に加え、心電図、胸部 X 線写真など循環器系のチェックが必要である。一回の採取顆粒球数は成人で 1×10^{10} 個以上を目標とし、血流速度を 50～60ml/分で行い所要時間は3時間を超えないことが望ましい。アフエレーシスに伴う副作用として、血管迷走神経反射(vasovagal reflex: VVR)や抗凝固剤によるクエン酸中毒がある。クエン酸中毒による低カルシウム血症の予防にはグルコン酸カルシウム液(5～10mL/hr)の持続注入やカルシウムイオン含有スポーツ飲料水の摂取が有効である。

造血幹細胞移植の細胞取扱いに関するテキスト（第2版）

>第4.6章 輸血に用いる顆粒球の取り扱い

また、顆粒球成分を効率よく分離する目的で HES が用いられている^{10),11)}。HES は分子量の違いにより高分子 HES (本邦では販売されていない)、中分子 HES と低分子 HES がある。赤血球沈降の効果は分子量が高い方が大きいため、海外では主に高分子 HES を併用して採取が行われている。高分子 HES には長期間の体内残留、凝固異常、ショックなどの副作用が報告されているが、顆粒球アフエレーシス時にドナー体内に入る HES の量は少ないため、リスクは限定されている。また、中分子 HES を用いた顆粒球採取の有効性についても報告されている¹²⁾。

アフエレーシス法(テルモ BCT Spectra Optia[®]:図 1)による顆粒球採取手順(HES あり、HES なし)を示す。

<必要物品>

ディスポーザブル回路(IDL セット 10317)、生食 1L、穿刺針 2 本、採血用シリンジ駆血帯、テープ、イソジン綿棒、アルコール綿、鉗子、※HESPAN 500mL(国内未承認、使用は施設判断)、※46.7% TRISODIUM CITRATE 30mL(院内薬剤部にて調剤)

※高分子 HES 使用時、46.7% TRISODIUM CITRATE と HESPAN は混合し使用(図 2)

※46.7% TRISODIUM CITRATE(病院薬局製剤第 5 版参照)

処方	クエン酸ナトリウム・2 水和物	46.7g
	クエン酸・水和物	0.2g
	蒸留水	全量 100mL



図 1 Spectra Optia[®]

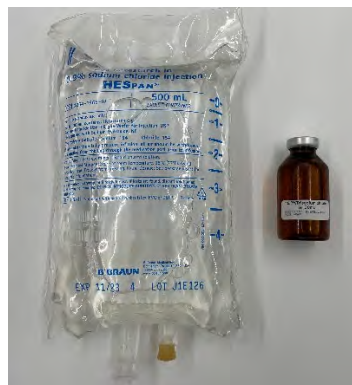


図 2 HESPAN、46.7% TRISODIUM CTRATE

<顆粒球採取手順>

- 1) Spectra Optia[®]の電源を入れる。
- 2) 回路を取り付け、プライミング後、アラームテスト(採血圧センサー、返血圧センサー、リークセンサー)。
- 3) 身長・体重・Hct 値データ・AC 比等、各種設定する。

- 4) HES 使用の有無(パッキングファクター)を選択(図 3)。
- 5) 血管確保を行う。血管確保後、採取直前のドナー検査用採血を行い、回路を接続。
- 6) HES を使用する場合、7,000 mL のアフェレーシスでは、46.7 % TRISODIUM CITRATE 30 mL に対して高分子 HES 500 mL の割合で、抗凝固剤注入ルートから持続投与する。
- 7) 採取中インターフェイスの調整
Spectra Optia® で HES 使用の場合 Spectra Optia® のカラーグラムで 7.5% の Hct 値になるように設定、HES 不使用の場合は 25～40 にプリファレンスを調整(図 4)。
- 採取中はグルコン酸カルシウム液を持続投与(図 5)。
- 8) 目標処理 7,000mL に到達後、採取直後のドナー検査用採血を行い、採取バックを取り外す(図 6)。
- 9) 採取バックにラベリングする(図 7)。
- 10) 採取バックから検査用検体をサンプリング後、X線照射装置で 15～50Gy 照射する。
- 11) 採取依頼伝票と照らし合わせ、交差適合試験結果を確認後、診療科へ出庫する。

※テルモ BCT:顆粒球(PMN)採取手順参照

<https://www.terumobct.com/Public/Optia%20PMN%20Brochure%20-%20Japan.pdf>



図 3

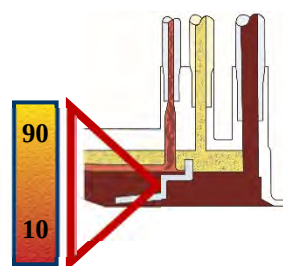


図 4 Spectra Optia®プリファレンス

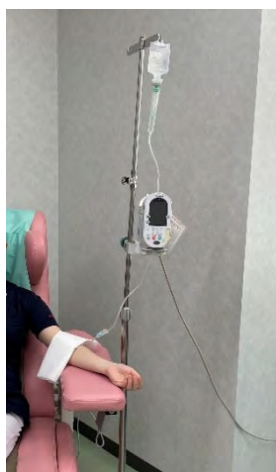


図5 グルコン酸カルシウム持続投与



図6



図7

2) バッグ法¹³⁾

＜必要物品＞ 2 サイクル採血する場合(図1)

輸血セット × 2 ケ、輸液セット × 1 ケ、自己血輸血用血液バッグ(トリプルバッグ・容量 400mL・採血針 18G) (品番:KBT-400CA8L©) × 2 ケ(図2)、日本薬局方生理食塩液(以下生食) 500mL バッグ × 1 ケ



図1



図2

＜使用機材＞

TSCD(テルモ社製無菌接合装置)(図3)、血液バッグ用陰圧型採血器(図4)、大型遠心分離機(久保田、日立)、分離スタンド、小型上皿はかり。

＜バッグ法採取手順＞

(1) 生食ラインを準備する(生食 500mL バッグを用いて輸液セットをプライミング

しておく。

- (2) ドナーに採取ベッドへ横になってもらい、バイタルを測定する。
- (3) 穿刺する血管を確認し、周囲を消毒する。無菌手袋を装着し、開封した無菌トリプルバッグを無菌的に受け取り、穿刺を行う。
- (4) 穿刺後、逆流が十分にあることを認め、疼痛や皮下出血などが無いことを確認してから、穿刺部位がずれないようにサージカルテープで固定する。
- (5) トリプルバッグを血液バック用陰圧型採血器にセットし、採取を行う。
- (6) 400mLの採血が終了したら、TSCDを用い、採血ルートを生食ラインでつなぎ替え、返血ルートとして確保する。返血ルート内に血液が残っていると凝固してしまうため、ドナー生食ラインのスピードは管内の血液が消失するまで速めて、その後ラインキープできる補液スピードに保つとよい。TSCDで生食ラインと接合の際、トリプルバッグ側のラインを十分に残すと、交差適合試験検体用、検査検体用のセグメントチューブを作成できる。
- (7) 採取した血液を輸血バッグごと大型遠心分離機で1,500rpm、15分間、20℃の設定で遠心する(図5)。
(回転数については1,500rpmとの報告もあるが、一定の見解はない。近年、福島医大病院においては、3,000rpmで施行している。)
- (8) バッグ内の血液は、血漿成分、buffy coat および赤血球層の3層に分離した状態になる。
- (9) これを分離スタンドにかけ、血漿成分をサブバッグ1へ分離する(図6)。このとき、buffy coat がサブバッグ1に流入しないように注意を要する。
- (10) buffy coat と赤血球層上部1/3をサブバッグ2へ分離する。(図7)サブバッグ2は小型上皿はかりの上に置き、採取顆粒球製剤の量の目安とする。
(buffy coat の白色部分がサブバッグ2に流入するよう指先でバッグ上部の出口部位を左右から優しく押して、流入の手助けをすると、効率よく回収できる)
- (11) サブバッグ2には60～100mLの顆粒球製剤が作成される。
- (12) サブバッグ1の血漿成分をメインバッグ(残りの赤血球層の2/3)へ移し、メインバッグの血液で輸血セットをプライミングし、TSCDを用いて生食ラインと輸血ラインを無菌的にラインの切り替えを行い、ドナーへ返血する。
- (13) (5)～(12)の操作を必要に応じ、2回繰り返す。最後に顆粒球製剤を1バッグにまとめ、X線照射装置で26Gy照射し終了する。所要時間は1回あたり、60分であり、2回繰り返して2時間弱程度で終了する。
- (14) 2サイクル後の返血の後、ドナーの貧血の程度により、生食ボトル内に含糖酸化鉄を混注して補液する。

造血幹細胞移植の細胞取扱いに関するテキスト（第2版）
＞第4.6章 輸血に用いる顆粒球の取り扱い



図3 無菌接合装置



図4 血液バッグ用
陰圧型採血器



図5 顆粒球遠心分離

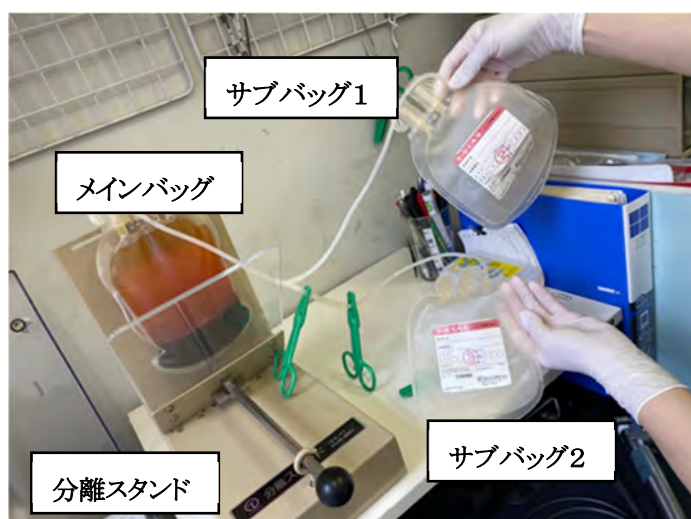


図6

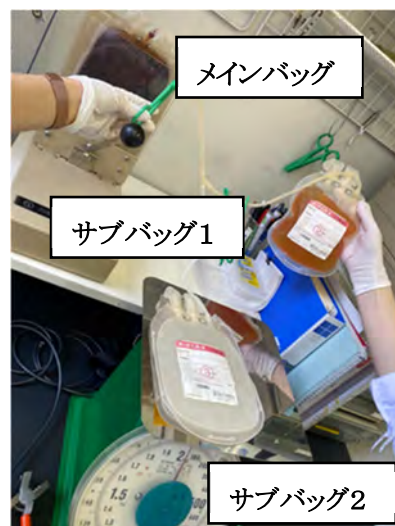


図7

(3) 顆粒球製剤の評価(資料参照)

- 1) 採取細胞数測定
- 2) レシピエントとドナーの交差適合試験

顆粒球製剤の投与法

(1) 投与法

好中球減少時の感染症では自力で造血回復が見込まれることが GTX の適応条件の1つであるので、造血回復までの期間に集中的に施行する。GTX のスケジュールは連日行うことが原則であるが、G-CSF で動員された顆粒球の寿命は延長しているので、隔日、あるいは、2投1休などの投与法も考えられる。

一般に顆粒球製剤は採取後、速やかに輸血する。保存する場合は室温(20～24℃)で

静置し、24 時間以内の使用が推奨される。製剤に対しては、輸血後 GVHD 予防の目的で必ず 15～50Gy の放射線照射を行う。白血球除去フィルターは使用せず、通常の輸血フィルターを用いる。

(2) 受血者の前処置

受血者に対する前処置としてアレルギー反応予防の目的で抗ヒスタミン剤および副腎皮質ステロイド剤(ヒドロコルチゾン 5mg/kg)の前投与を行う。輸血は緩徐に行い、輸血中は輸血関連急性肺障害の早期発見のために経皮酸素モニターを装着し、呼吸数、心拍数、SpO₂を観察する。アムホテリシン B 投与中の顆粒球輸血による致命的肺障害の報告があるため、アムホテリシン B(リポゾーム化製剤含む)の投与終了から顆粒球輸血まで 4～12 時間、間隔をあける。

輸血顆粒球数

前記したように第 III 相試験 1 において顆粒球輸血の有効性について証明することができなかったため、必要な顆粒球数の閾値についても確定的なデータはない。ただし、本試験では、患者体重あたり $0.6 \times 10^8/\text{kg}$ を超える顆粒球を輸注された症例における有効性が示唆された。また、従来の臨床研究のメタアナリシスでは、効果を得るには少なくとも 1×10^{10} (/body) の顆粒球が必要であることが示唆されている¹⁴⁾

GTX の効果判定と中止基準

臨床効果の判定基準は局所所見の改善、全身状態の改善、解熱、CRP 低下、細菌学的検査所見の改善、画像所見の改善などを指標とする。

一般に GTX 1 時間後のレシピエント末梢血好中球数が GTX 後の好中球増加の指標となる。レシピエント体重 kg 当り 3×10^8 個の顆粒球が輸血されると、500/ μL 程度の増加が見込まれるが、輸血顆粒球数と GTX 後の好中球数は必ずしも相関はしない。好中球増加が認められなくとも臨床効果が得られることもあるので、過量の顆粒球数を輸血することは必要である。

GTX を中止する目安として、自己造血回復($\text{ANC} \geq 500/\mu\text{L}$)、感染症のコントロールが可能と判断される場合、GTX の施行にもかかわらず症状が悪化するなど効果が認められない場合、GTX による副作用が出現した場合、速やかに中止する。

副反応

(1) アレルギー反応

通常の輸血と同様に蕁麻疹、皮膚紅潮、血管性浮腫がみられる。

(2) アナフィラキシー反応

アレルギー反応にとどまらず全身症状として、腹痛、下痢、嘔吐、呼吸困難、喘鳴、頻脈、血圧低下、意識障害に陥る。

(3) 発熱、悪寒

顆粒球の輸血により白血球から放出される各種サイトカインにより生じると考えられているが、抗ヒスタミン剤、コルチコステロイド剤の前投薬で頻度は減少する。

(4) 肺障害

肺障害は最も重要な合併症であり、その発症頻度は報告により 0-53%と大きく異なる¹⁵⁾。機序の一つとして肺炎(感染部位)への顆粒球遊走による炎症の一時的な悪化が考えられ、肺炎を合併した症例に対する顆粒球輸血時には特に注意が必要である。

(5) 免疫感作

GTX により抗 HLA 抗体、抗顆粒球抗体の出現が報告されている。原疾患および検査方法により検出頻度が異なり、慢性肉芽腫症に対する長期間(6 週間以上)かつ頻回の GTX では 80%に HLA 抗体が出現したという報告がある。顆粒球輸血後の HLA 抗体産生が肺合併症、移植後の生着不全のリスクになるという報告もあるが、臨床的意義および HLA 抗体検査の必要性については定まっていない¹⁵⁾。

(6) 感染症

通常の輸血に見られる感染症は理論上全て発生しうる。顆粒球輸血後の CMV 感染の報告があり、特に造血幹細胞移植時に CMV 既感染ドナーから GTX を施行した場合には注意を要する。

採取ドナーの安全性確認検査と採取後フォローアップ

顆粒球動員に伴う合併症や、顆粒球採取に伴う合併症は一定の頻度で発生するため、健常人であるドナーの管理には注意を要する。末梢血幹細胞ドナーに準じた安全性確認検査の実施と中長期フォローアップを行うことが望ましい。当院におけるフォローアップ内容につき下記に示す。

投与前血液検査:血液検査 生化学検査

採取直前血液検査:血液検査 生化学検査

採取直後血液検査:血液検査

採取後検診(採取後 1 か月):診察 血液検査 生化学検査

健康調査アンケート用紙送付:採取後 3 か月、1 年後、2 年後、3 年後、4 年後、5 年後

その他の管理体制

1) 機器・資材の確認

有効期限の確認・記録、LOT 記録、使用時の外観確認・記録、使用者の記録

2) 採取時ドナー確認

患者確認、採取時の問診、採取中の管理(合併症・副反応の確認)・記録

3) 血液細胞の管理(ナンバリング)

取り違い防止、照射済みの明示、採取日や投与期限などの明示

4) 出庫時製剤確認

採取指示票と製剤ラベルの照合、払出者・受取者のサイン

5) 輸注時副反応確認

輸血用血液製剤に準じた投与実施管理と記録

6) 遡及調査対応

不具合発生時に備え、血液細胞サンプルおよび採取前末梢血の保管

ガイドライン（案）

以前、顆粒球輸血研究会から GTX に関するガイドライン（案）が提唱されている^{6),7)}。目的はドナーと受血者双方の安全性確保と GTX を効果的に行うことであり、適応や手技的な項目だけでなく、責任体制の整備、倫理委員会の承認など施設としての適格性を強調している。GTX を実施しようとする施設では遵守されることを勧める。

参考文献

- 1) Price TH, Boeckh M, Harrison RW, et al. Efficacy of transfusion with granulocytes from G-CSF/dexamethasone-treated donors in neutropenic patients with infection. Blood 2015;126:2153-61.
- 2) Netelenbos T, Massey E, de Wreede LC, et al. The burden of invasive infections in neutropenic patients: incidence, outcomes, and use of granulocyte transfusions. Transfusion 2019;59:160-8.
- 3) Clinical guidelines for the use of granulocyte transfusions. NHS Blood and Transplant; <https://hospital.blood.co.uk/clinical-guidelines/nhsbt-clinical-guidelines/>.
- 4) Kuijpers TW, Weening RS, Roos D. Clinical and laboratory work-up of patients with neutrophil shortage or dysfunction. J Immunol Methods 1999;232:211-29.
- 5) Estcourt LJ, Stanworth S, Doree C, et al. Granulocyte transfusions for preventing infections in people with neutropenia or neutrophil dysfunction. Cochrane Database Syst Rev 2015;2015:Cd005341.
- 6) Ohsaka A, Kikuta A, Ohto H, et al. Guidelines for safety management of granulocyte transfusion in Japan. Int J Hematol 2010;91:201-8.
- 7) 大坂 顕, 大戸 斉, 菊田 敦, et al. 安全な顆粒球輸血を目指したガイドライン案の作成. 日本輸血学会雑誌 2004;50:739-45.
- 8) 日本造血・免疫細胞療学会. 造血細胞移植ガイドライン 造血幹細胞採取(第2版).
- 9) 輸血療法の実施に関する指針.
- 10) Yoshihara S, Ikemoto J, Onomoto H, et al. Impact of the use of hydroxyethyl starch in granulocyte apheresis using Spectra Optia. Transfus Med 2021;31:365-70.
- 11) Ikemoto J, Yoshihara S, Fujioka T, et al. Impact of the mobilization regimen and the

harvesting technique on the granulocyte yield in healthy donors for granulocyte transfusion therapy. Transfusion 2012;52:2646-52.

12) Nanya M, Yurugi K, Kato I, et al. Successful granulocyte apheresis using medium molecular weight hydroxyethyl starch. Int J Hematol 2019;110:729-35.

13) 菊田敦、大戸斉. 顆粒球輸血. 小児輸血学 2006;中外医学社:227-38.

14) Estcourt LJ, Stanworth SJ, Hopewell S, Doree C, Trivella M, Massey E. Granulocyte transfusions for treating infections in people with neutropenia or neutrophil dysfunction. Cochrane Database Syst Rev 2016;4:Cd005339.

15) Yoshihara S, Ikemoto J, Fujimori Y. Update on granulocyte transfusions: accumulation of promising data, but still lack of decisive evidence. Curr Opin Hematol 2016;23:55-60.

（執筆者：池本純子、大原喜裕、吉原哲、査読者：新井康之）

資料

顆粒球製剤報告書

使用日 年 月 日 時

■ レシピエント

輸血患者名: _____

ID: _____

ABO 血液型: _____ RhD 血液型 _____

不規則抗体: 無・有 (_____)

疾患名: _____

患者体重: _____ kg

適応感染症: _____

起因菌: _____

■ ドナー

ドナー名: _____

ID: _____

年齢: _____ 歳

ABO 血液型: _____ RhD 血液型 _____

不規則抗体: 無・有 (_____)

■ レシピエント/ドナー交差適合試験

	生理食塩液法	間接抗グロブリン試験
主試験	適合 ・ 不適合	適合 ・ 不適合
副試験	適合 ・ 不適合	適合 ・ 不適合

■ 顆粒球製剤

WBC _____ / μ L

好中球数 _____ %・/ μ L

重量 _____ g

総好中球数 _____ $\times 10^9$ 個 = _____ $\times 10^8$ /kg 患者体重

特記事項 _____

X線照射担当者: _____

照射量: _____ Gy

処理担当者: _____

処理日: _____ 年 月 日 時

責任者: _____

確認日: _____ 年 月 日

第4.7章 体外フォトフェレーシス

はじめに

移植片対宿主病(GVHD)は、造血幹細胞移植後に生じる最も重要な合併症の一つで、ドナー由来免疫細胞が宿主(患者)の組織を異物とみなすことによって生じる病態である。なかでも慢性 GVHD は様々な臓器が標的となり、多彩な症状を引き起こす¹⁾。慢性 GVHD に対する一次治療としてステロイド治療が行われるが、改善がみられない、あるいはステロイドを減量できない患者や、ステロイド長期使用に伴う有害事象により不耐容となる患者も少なくない。そのため有効性と安全性を両立した治療の開発が望まれている。

体外フォトフェレーシス(extracorporeal photopheresis, ECP)は、患者血液から体外循環で単核球を分離して、その単核球に光感作物質であるメキサレンを添加して長波長紫外線(UVA)を照射した後に、患者体内へ戻す治療である²⁾。海外では慢性 GVHD に対して既に広く用いられ、本邦でも2023年から保険償還され実臨床で使用可能になっている。

原理

ECP で使用される光感作物質のメキサレンは、ナイル川やインダス川流域に生息する植物に含まれており、これらの植物は紀元前から皮膚疾患に生薬として用いられていた。1970年代から、尋常性乾癬、皮膚T細胞リンパ腫(CTCL)に対するPUBA療法(ソラレン全身投与後にUVAを皮膚に照射する)の有効性が報告された。その後、皮膚外病変を有するCTCLに対する治療としてECPが開発され、1988年に米国食品医薬品局(FDA)に承認された³⁾。1994年に治療抵抗性慢性GVHDに対する最初の症例報告がなされ、その後各国からECPの有用性を示す多数の報告がなされている⁴⁾。

ECPの慢性GVHDに対する効果の機序は不明な点が多いが、ECP治療の過程で、添加されたメキサレンがリンパ球のDNA間隙に入り込み、紫外線照射によってDNAピリミジン塩基と共有結合を形成することでDNA鎖間を架橋して、DNA複製と細胞増殖を阻害してアポトーシスを誘導する⁵⁾。さらにアポトーシスによって免疫細胞を抑制するだけでなく、アポトーシスを生じたリンパ球が体内で抗原提示細胞に貪食されることによって、制御性T細胞が誘導され、T細胞あるいはB細胞の亜集団の変化を介して免疫寛容が誘導される機序が想定されている^{6),7)}。

実際の治療方法

ECP療法には、オフライン方式とインライン方式がある。前者は、成分採血装置で採取した単核球を、UVA透過性バッグに入れてメキサレンを添加後に別装置でUVA照射を行うものである。一方、後者では、成分採血装置にUVA照射装置を装備させ、単核球分離からUVA照射と再輸注までの過程を、1つの装置の閉鎖回路内で完結させることが可能となっ

ている。インライン方式は、機械操作の労力を軽減して処理過程の取違いを防ぎ、安全性を向上させるとともに、全体の治療時間が短縮されることから患者負担を軽減できる。2024年4月現在、本邦で使用可能なインライン方式 ECP には CellEx ECP®システムがある⁸⁾。血管アクセス、成分分離、光励起、再輸注の各ステップについて概説する。

(1)血管アクセス

ECP 実施にあたりルート確保が重要である。中心静脈カテーテルは留置時の合併症リスクに加えて、長期留置に伴う感染症や血栓形成のリスクがあるため、末梢静脈にルート確保することが理想であるが、ECP の対象となる症例の多くは濃厚な治療歴や皮膚硬化のため末梢静脈ルート確保が困難なことが少なくない。患者状態や施設環境に応じて適切なルートを選択する。流量 15mL/分以上を確保できることが望ましい。

(2)モード選択とプライミング

CellEx ECP®システムでは、ダブルニードルモードとシングルニードルモードが選択可能である。ダブルニードルモードでは成分分離過程において脱血と返血が同時に行われる。一方シングルニードルモードでは、脱血と返血が交互に行われ、ダブルニードルモードより治療時間が長くなるが、ルート確保が1か所であることがメリットである。これらのモードの変更は、治療中いつでも可能である。

CellEx ECP®システムで用いる閉鎖式回路では、体外循環血液量はシングルニードルモードでやや多いが、おおむね 200mL 程度とされる。循環血液量の少ない小児では赤血球製剤を用いて回路のプライミングを実施する。

(3)成分分離

血液処理を実施して、buffy coat が分離される。CellEx ECP®システムでは遠心分離ボール内での buffy coat の分離状況がレーザー光の吸光度でモニターされており、吸光度が規定値に達すると、buffy coat が処理バッグへ送られる。1回の治療あたりの処理血液量は 1.5L が標準的で、血液流量が 30mL/分の場合は約 50 分で成分分離が完了する。

(4)光励起

採取された buffy coat 細胞数と混入する赤血球数などに基づいて、必要なメキサレン添加用量と UVA 照射時間がシステムによって自動計算され、操作画面に表示される。操作画面の指示に従ってメキサレン溶液必要量を手動的に処理バッグに注入して、操作画面を前に進めると、buffy coat は処理バッグから UVA 照射チャンバーに送られて UVA が照射される。約 15 分～20 分間で工程は完了する。

(5)再輸注

UVA 照射が終了すると自動的に血液が患者に再輸注され、回路内がリンスされる。この工程は約 20～25 分で完了する。脱血開始から再輸注終了までの所要時間は、ダブルニードルモードで、脱血速度 30mL/分、血液処理 1.5L の場合、約 1 時間 40 分である。

(6) 治療スケジュール

ECPの標準的な治療スケジュールを表1に示す。第1週は1日1回を連続3日間、第2～12週は毎週連続2日間、第16～24週は4週毎に連続2日間で、計31回実施する。患者の状態に応じて治療を継続する⁸⁾。

外来での導入も可能であるが、末梢静脈ルート確保が困難な場合も多く、第12週までは、治療頻度が高いことから入院下で導入を考慮する。入院下では、治療効果判定や他の免疫抑制剤の減量調節を綿密に行うことができるメリットがある。また本療法は、繰り返し実施することも可能である。

治療期間	頻度	治療日数	治療回数
第1週	－	1日1回を 連続3日間	3回
第2～12週	毎週	1日1回を 連続2日間	22回
第16～24週	4週毎	1日1回を 連続2日間	6回

表1 標準的な治療スケジュール

過去の臨床試験

(1) 海外第II相試験 (GVHD-SK1)

2008年に、Fred Hutchinson Cancer Research Centerを中心とした米国のグループから、ステロイド抵抗性、不耐容もしくは依存性の慢性GVHD患者を対象としたECPの無作為化、単盲検、多施設共同第II相試験の成績が報告された⁹⁾。皮膚病変を有する慢性GVHD患者95例が、標準治療とECPを行うECP群48例、標準治療のみを行う対照群47例に無作為割り付けされた。標準治療は、ステロイドとシクロスポリンまたはタクロリムスの2剤併用、あるいはミコフェノール酸モフェチルを加えて3剤併用療法とされた。主要評価項目は、治療開始後12週時のtotal skin score (TSS)のベースラインからの変化率であった。TSSは被験者の皮膚を10領域に分け、それぞれの領域における各グレード(Grade0 正常～Grade 4 硬化(可動性はなく、挟むことができない))に該当する病変の面積の割合を評価して算出された。変化率の中央値はECP群で-14.5%、対照群で-8.5%であり、ECP群で改善率が大きい傾向を認めたが有意差はなかった。副次評価項目の治療開始12週時においてステロイド投与量を50%以上減量かつTSSが25%以上改善した患者割合は、ECP群が8.3%であったのに対して、対照群では0%で、ECP群が有意に良好であった。重篤な有害事象の発現割合はECP群で28.6%、対照群で26.0%であったが、ECP治療に関連すると判定された重篤な有害事象はなかった。

(2) 国内臨床試験 (TKS-01)

本邦からは、ステロイド抵抗性または不耐容の慢性GVHD患者15例を対象に国内3

施設が参加して実施された多施設共同第II相試験の結果が、2018年に報告された¹⁰⁾。主要評価項目は、ECP開始時後24週時の治療効果と、ステロイド投与量の減量効果を組み合わせた複合評価項目とされ、治療効果が奏効（完全奏効および部分奏効）もしくはステロイド投与量減量の場合に、有効と判定された。評価可能な12例中8例（66.7%）で有効と判定された。ECP治療と関連する可能性のある重篤な有害事象は5件認められた（心不全1例、医療機器内血栓1例、肺炎1例、浮腫1例、喘鳴1例）が、ECP治療と関連する可能性のある死亡例は認めなかった。

(3) 各臓器における奏効

UK Photopheresis Societyが、ECPに関するconsensus statement改訂版を2017年に発表しており、その中で各臓器におけるECPの奏効割合についてsystematic reviewによる評価を行っている¹¹⁾。27研究から725症例を評価され、全体の奏効割合は68%で、奏効割合が高い臓器から順に、皮膚（74%）、口腔粘膜（62%）、肝臓（62%）、眼（60%）、消化管（46%）、肺（46%）で、皮膚、粘膜、肝臓での有効性が高いことが示唆された。

安全性

ECP処置による有害事象は、成分採血によるものと、メキサレンと光励起に伴うものに分けられる。成分採血による有害事象は、他のアフエレーシスとも共通しており、血圧低下や血管迷走神経反射、抗凝固に用いるクエン酸による低カルシウム血症、血小板減少が挙げられる。血液処理量が1.5Lと少ないため、通常は低カルシウム血症の程度は軽く、カルシウム補充は不要のことが多い。回路内の血液は患者にリンスバッグされるが、処置毎に約40～50mL程度の血液が喪失する。ECPは他のアフエレーシスと異なり、1症例あたりに実施する処置回数が多いため、鉄欠乏によって経過中に貧血が進行することが少なくない¹²⁾。貧血は、遠心による成分分離にも不利であり、成分分離に時間がかかると機械エラーの原因になり得るので、貧血が進行する場合には赤血球輸血を早めに検討する。

メキサレンと光励起に伴う副作用としては、嘔気・嘔吐、頭痛、発熱、光線過敏、皮膚がんが想定されるが、現在のECPは分離された単核球に直接メキサレンを添加することから、体内に投与されるメキサレンの量は少なく、PUVA療法における投与量の1/100以下である。しかし治療後24時間は、眼や皮膚を紫外線から守るよう指導することが推奨されている。

ECP治療そのものが免疫低下をもたらす可能性を示唆する報告はなく、この点で他の治療として用いられる薬剤より有利である¹³⁾。慢性GVHDに対する治療についての有害事象発現件数のsystematic reviewでは、慢性GVHD患者1例あたり3か月間でgrade3～5の有害事象が発現する件数は、ECP治療では0.10～0.13で他の治療より少なく、安全性は高いと推測される¹⁴⁾。ただし、FDAは、CellEx ECP®システムで治療された患者で肺塞栓症が複数報告されたことから、注意喚起を行っている。国内第II相試験でも医療機器内血栓が1例報告されており¹⁰⁾、添付文書において注意喚起がなされている。

今後の課題

近年、慢性 GVHD に関する基礎研究と病態に沿った薬剤開発が進み、本邦でもシグナル伝達を標的とした JAK 阻害剤 ruxolitinib¹⁵⁾や、BTK 阻害剤 ibrutinib¹⁶⁾が使用可能になっている。さらに、細胞の運動や増殖、生存に関わり、免疫応答に重要な役割を果たすシグナル分子 ROCK2 の選択的阻害剤 belumosudil の有効性が示され¹⁷⁾、2024 年に本邦でも認可された。また、慢性 GVHD において組織の線維化に関与する、マクロファージに発現する CSF-1R に対する抗体薬 axatilimab の治療効果¹⁸⁾が報告されるなど、本邦でも新規薬剤への期待が高まっている。ECP 治療は、現状では実施できる施設が限定されていることや、血管アクセス、各 ECP セッションに2時間程度を要する点などの特殊性があるが、薬剤による治療と比較して、患者に不利益な免疫低下作用が弱く、治療終了後も持続的な免疫調節作用が期待されるなどの独特のメリットも有している。今後は、ECP 治療奏効の機序の詳細な解明や、他剤との併用¹⁹⁾や治療タイミングの工夫をとおして治療効果を高める運用面の工夫が求められる。

参考文献

- 1) 日本造血・免疫細胞療学会. 造血細胞移植ガイドライン GVHD (第5版). https://www.jstct.or.jp/uploads/files/guideline/01_02_gvhd_ver05.1.pdf (Accessed 2024 Oct. 1)
- 2) 加畑馨. Extracorporeal Photopheresis の現状と展望. 日本アフェレシス学会雑誌 2020;39(1):24-27.
- 3) Cho A, Jantschitsch C, Knobler R. Extracorporeal Photopheresis-An Overview. Front Med (Lausanne). 2018;5:236.
- 4) Hart JW, Shiue LH, Shpall EJ, Alousi AM. Extracorporeal photopheresis in the treatment of graft-versus-host disease: evidence and opinion. Ther Adv Hematol. 2013;4(5):320-334.
- 5) Frobel S, Reiffers A, Torres Ziegenbein C, Gilch P. DNA Intercalated Psoralen Undergoes Efficient Photoinduced Electron Transfer. J Phys Chem Lett. 2015;6(7):1260-1264.
- 6) Hannani D, Merlin E, Gabert F, et al. Photochemotherapy induces a faster apoptosis of alloreactive activated T cells than of nonalloreactive resting T cells in graft versus host disease. Transplantation. 2010;90(11):1232-1238.
- 7) Heshmati F. Updating ECP action mechanisms. Transfus Apher Sci. 2014;50(3):330-339.
- 8) マリンクロット ファーマ株式会社. Cellex ECP システム概要. https://mallinckrodt.jp/cellex/images/doc/CellexECP_overview.pdf (Accessed 2024 Oct. 1)
- 9) Flowers ME, Apperley JF, van Besien K, et al. A multicenter prospective phase 2 randomized study of extracorporeal photopheresis for treatment of chronic graft-versus-host disease. Blood. 2008;112(7):2667-2674.
- 10) Okamoto S, Teshima T, Kosugi-Kanaya M, et al. Extracorporeal photopheresis with TC-

V in Japanese patients with steroid-resistant chronic graft-versus-host disease. *Int J Hematol*. 2018;108(3):298-305.

11) Alfred A, Taylor PC, Dignan F, et al. The role of extracorporeal photopheresis in the management of cutaneous T-cell lymphoma, graft-versus-host disease and organ transplant rejection: a consensus statement update from the UK Photopheresis Society. *Br J Haematol*. 2017;177(2):287-310.

12) Moosavi MM, Goodman AL, Duncan A, et al. Development of iron deficiency anemia in patients undergoing extracorporeal photopheresis: Comparison of the UVAR and CELLEX instruments. *J Clin Apher*. 2021;36(1):34-40.

13) Nygaard M, Wichert S, Berlin G, Toss F. Extracorporeal photopheresis for graft-vs-host disease: A literature review and treatment guidelines proposed by the Nordic ECP Quality Group. *Eur J Haematol*. 2020;104(5):361-375.

14) Velickovic VM, McIlwaine E, Zhang R, Spelman T. Adverse events in second- and third-line treatments for acute and chronic graft-versus-host disease: systematic review. *Ther Adv Hematol*. 2020;11:2040620720977039.

15) Zeiser R, Polverelli N, Ram R, et al. Ruxolitinib for Glucocorticoid-Refractory Chronic Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med*. 2021;385(3):228-238.

16) Waller EK, Miklos D, Cutler C, et al. Ibrutinib for Chronic Graft-versus-Host Disease After Failure of Prior Therapy: 1-Year Update of a Phase 1b/2 Study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019;25(10):2002-2007.

17) Cutler C, Lee SJ, Arai S, et al. Belumosudil for chronic graft-versus-host disease after 2 or more prior lines of therapy: the ROCKstar Study. *Blood*. 2021;138(22):2278-2289.

18) Kitko CL, Arora M, DeFilipp Z, et al. Axatilimab for Chronic Graft-Versus-Host Disease After Failure of at Least Two Prior Systemic Therapies: Results of a Phase I/II Study. *J Clin Oncol*. 2023;41(10):1864-1875.

19) MacDonald KP, Hill GR, Blazar BR. Chronic graft-versus-host disease: biological insights from preclinical and clinical studies. *Blood*. 2017;129(1):13-21.

（執筆者：城友泰、新井康之、査読者：藤原実名美）

第5.1章 細胞処理の基本

はじめに

本項では、FACT-JACIE 基準の HEMATOPOIETIC CELLULAR THERAPY がカバーする部分として、骨髄や末梢血より採取した細胞のほか、臍帯血および間葉系幹細胞等の再生医療等製品を対象に、細胞処理を行う上で基本となる体制や管理について概説する。

細胞処理を行う体制

(1)人的体制

院内で細胞処理を行う際には、「細胞処理責任者」と「品質管理責任者」の設置が望ましい。細胞処理責任者は細胞処理に習熟した医師が担当し、細胞処理が適切な技術のもとに行われ、また処理後の血液細胞製剤が適切に管理されるよう努めることが責務である。一方、品質管理者責任者は、細胞治療認定管理師資格を有するスタッフ（医師であることを要件としない）が担当し、標準作業手順書の見直し、変更、承認に関する規約の作成がその責務である。細胞処理責任者は、より独立した立場からの管理を行うため、細胞採取責任者、および血液細胞製剤を用いた治療（臨床部門）の責任者と別であることが望ましいが、兼任は可である。一方、品質管理責任者は、細胞採取、細胞処理それぞれに置くことが望ましいが、こちらも兼任可とする。ただし、細胞処理責任者と品質管理責任者は独立している必要があり、兼任は許容されない。

細胞処理に関わるスタッフは、細胞治療に関する教育プログラムに少なくとも年間 10 時間は参加し、その記録を残すことが望ましい。

(2)文書体制

細胞処理を行うためには、標準作業手順書(Standard Operating Procedures:SOP)と作業工程記録書を揃える。SOP には、下記の項目を網羅する必要がある:処理の対象となる細胞の受領、各々の細胞処理手順、取り違えと交差汚染の防止、細胞製剤へのラベル貼付、凍結保存および解凍、製剤の有効期限、機材に不具合があった場合の代替方法、製剤の保管、製剤の出庫(病棟・他施設)、製剤の廃棄方法、清掃および衛生管理の手順と責任者、環境モニタリングを含む環境管理の方法、個人防護具の装着を含めた標準予防策の適用、医療廃棄物の処理、緊急時対応、事業継続計画(BCP)。

細胞処理担当者は最新の SOP を所持し、作業時はいつでも参照できるようにするとともに、SOP からの逸脱が予定されている場合は、細胞採取責任者が事前に承認し、品質管理者責任者によるレビューを受けること。品質管理に関連する記録、教育記録等については法令の定める期間保管すること。

衛生管理

細胞処理（分離、凍結、細胞製剤の調製作業など）を行うにあたり、最も基本的なことは「清潔な操作」を可能にする管理である。細胞製剤は、他の薬剤と異なり「滅菌」ができないため汚染・混入（コンタミネーション）に注意する必要がある。またこれらの処理を行うスペースは、十分な照明、換気、給排水が整備されることはもちろんのこと、十分な広さを有し、空気中の微生物汚染のリスクを最小限に抑えるように設計されていることが重要である。加えて、作業で出た廃棄物を適切に処理する体制も重視されている。このような衛生管理をする上で、管理区域内には、許可を得た職員のみでの立ち入りが可能である。

(1) 作業者の手洗い

細胞調製前および後には、必ず手洗いを施行する。手洗いは、衛生的な手洗いを実施する。手順は、1)流水で手指から手首までを十分に濡らす、2)石けん液を手のひらに取る、3)手の平、指の腹面を洗う、4)「手の甲、指の背」を洗う、5)「指の間(側面)、指の付け根」を洗う、6)「親指と親指の付け根」を洗う、7)「指先」を洗う、8)「手首」を洗う、9)流水で3)～7)と同様の手順で手を洗う、10)使い捨ての紙タオルで水分を十分に拭き取る、である。手順を着実に遵守するため、手洗い場にポスターを掲示することが有効と考える。図1に京都大学で用いているポスターを例示する。



図1 流水を用いる場合の手洗い方法

滅菌手袋着用前に消毒液で手指消毒を行う。一般的な手順としては、1)消毒液を手に取る、2)「手のひら、指の腹面」をすり合わせる、3)「指先、指の背」をこする、4)「手の甲」をこする、5)「指の間(側面)、股(付け根)」をこする、6)「親指と親指の付け根」をこする、7)「手首」をこする、8)乾くまで手指をすり合わせる、である。こちらも同様にポスター掲示が有効である(図2)。



図2 消毒液を用いた手指消毒手順

消毒後、滅菌手袋を着用する。着用にあたっては、滅菌面を不潔にしないように、十分に注意するとともに、手袋着用後も、細胞調製室内では頻繁にエタノールを用いた手指消毒を行う。脱着時も定められた手順に従って環境汚染を防ぐことが必要である(図3)。

滅菌手袋着用手順

手洗い・手指消毒に関するSOP
424別紙4:滅菌手袋着用脱着ポスター
Ver.1 (2023.07)



滅菌手袋脱着手順



図3 滅菌手袋着用・脱着手順

(2) 作業者の健康

「健康な細胞製剤は、健康な作業員から製造される」という基本概念に基づき、製造作業員は、日常的に健康に配慮する必要がある。特に感染症および外傷は、細胞への影響もあるが、製造作業員自身を危険にさらす場合がある。加えて、作業員が所属先で受検している定期健康診断も活用し、定期的な健康管理も含めて実施するようにする。入室記録には、健康状態も合わせて記録することが望ましい。

(3) 作業者の服装

細胞製造の場合の最も重要な汚染源は、「ヒト」である。作業実施の場合の服装については、作業場面と場所により異なると考えられる。一般にグレード C (ISO クラス分類 8) 以上の清浄度が求められる場所では、専用のユニフォームに着替えた上で、マスク、キャップ、手袋を着用し（一次更衣）、さらにグレード B (ISO クラス分類 7) の室内では無塵衣などの二次更衣を行って、清浄度を維持できるよう注意する。

一方で、空気清浄度が管理されていない一般エリアにおいて、密封された細胞製剤を扱う際には服装の規定はなく、個人防護具の装着を含めた標準予防策（スタンダードプリコーション）を適用するとよい。ただし、クリーンベンチや安全キャビネット内で作業を行う場合は、埃の発生を極力少なくすべく、マスク、キャップ、手袋を装着した上で、「白衣の袖口を手袋の中に入れる」等の工夫が必要である。

(4) 細胞調製室の清掃

清掃は、作業毎に行う「日常清掃」と期日を決めて行う「定期清掃」がある。細胞調製室や細胞製剤について清浄度を維持管理し、製剤への汚染防止をするため清掃方法や製造頻度をあらかじめ決めておく事が重要である（衛生管理基準書）。また、清掃および衛生状況をモニタリングし、記録に残し、3年以上保存する必要がある。

清掃に用いる消毒薬の一般的な選択は、①対象微生物に殺菌性があること、②作業性が良いこと、③細胞および人体に影響が少ないこと、④原液の安定性があり保存が容易なこと、⑤低濃度で殺菌性があり殺菌時間が短いこと、⑥製造機器への残留性・吸着性が少ないこと、⑦構造設備や機器への腐食性が少ないこと、⑧周囲の環境に対して汚染が少ないこと、⑨低コストであること。このような条件を考慮すると、「70%消毒用アルコール」が一般的だと考える。消毒用エタノールのスプレーボトルは予め滅菌したものを使用し、継ぎ足しはしない。また、汚染の状況によっては、両性イオン界面活性剤や次亜塩素酸、過酢酸などを用いた消毒も行うが、必要に応じて残留している消毒液を消毒用エタノール等でふき取る必要がある。

以下、清掃部位に分け、京都大学医学部附属病院で行っている手順を参考に注意点を概説する。

a) 機器類の清掃

機器装置類は、70%消毒用エタノールを染み込ませた清拭用ワイプで清拭することが一般的である。清拭する際は、適宜消毒に十分なエタノールを染み込ませ、拭き戻しをしないように注意する。作業後毎の清掃時、細胞が付着する可能性がある部分や手袋が触れた部分（安全キャビネット内、インキュベーターの扉部、遠心機の操作盤、薬用保冷庫の扉など）は特に念入りに清拭する。

b)床の清掃

モップに専用の不織布を取り付け、消毒に必要な量の消毒液を不織布に行き渡らせる。専用の不織布は交差汚染防止のために使い捨てとし、モップは各部屋専用の物を使用する。床は、比較的清潔な部分から汚染されている部分へ向かって清拭する。床を清拭する際も、拭き戻しをしないように注意する。

c)壁の清掃

壁は垂れない程度に 70%消毒用エタノールをスプレーで吹きかけ、70%消毒用エタノールを染み込ませた清拭用ワイプで下へ方向に清拭する。ここでも、拭き戻しをしないことが重要である。床面と壁面の間の目地の埃を清拭し、ワイプが目視で汚れたら新たな面に換える。

d)パスボックスの清掃

パスボックス内に 70%消毒用エタノールをスプレーで吹きかけ、70%消毒用エタノールを染み込ませた清拭用ワイプで一方向に清拭し、拭き戻しをしない。

入出庫管理

(1)入庫管理

細胞そのものに ID や名前を書くことは出来ないため、細胞製剤が入ったバッグ(一次容器)には必ず識別可能なラベルを貼付し、取り違い、交差汚染を防止するために可能な限り複数ロットの細胞製剤を同時に扱わないことが、入出庫管理の鉄則である。血液細胞製剤の保管場所は、管理された領域に設定する。

入庫時には、特に外部から持ち込まれた細胞製剤の場合、目視で外観チェックを行った上で、添付されているラベル情報を添付書類とともに間違いなく識別し、院内の管理システムとの紐付けを行った上で、必要に応じて院内ラベルの発行を行う。ラベル情報は、出庫時にも識別しやすい表示とし、細胞製剤を使用する臨床医も簡単に認識できる表記にすることが重要である。具体的には、患者名、患者 ID、製造年月日、製剤番号、製剤名等を明記し、予め細胞処理責任者がテンプレートを承認しておくことが望ましい。テンプレートに記すべき情報は、電磁的に施設の保管管理システムに入力し、払い出し時に照合できる体制にすることが望ましい。いずれの作業も誤りが無いか、2 人以上での確認が望ましい。

(2)保管中の管理

入庫から出庫まで時間を要することが想定される場合には、予め細胞製剤の保管期間および保管条件に関する手順を作成する。細胞製剤を保管する場合には、必要に応じて施錠するなど保管場所の管理を行い、取り違い、汚染、交差汚染、部外者による無断持ち出しを防止する。製剤ごとに保管する期間、条件(温度の範囲)を SOP に定めた上で、細胞製剤の保管に必要な機器のモニタリングを行う(温度や液体窒素残量など)。

(3)出庫管理

出庫に際しては、患者名、患者 ID、製造年月日、製剤番号、製剤名、投与予定日、出庫先施設・診療科名、主治医の氏名等の細胞製剤情報の確認を行う。この情報は製剤本体あるいは保管容器にラベルとして貼付し、出庫者と搬送者で外観のチェックを行う。払出票や部門システムに双方が出庫時刻の記載と署名（あるいは電子サイン）をすることで、取り違い防止とともに確実な払出記録となる。

細胞製剤の出庫に当たっては、製剤バッグ破損時の漏洩に備えてジッパー付きの包装袋等によりさらに包装する。特に、別施設に出庫する製剤バッグは、内容物の漏洩、衝撃、圧力変化、温度変化等に耐えられる材料で作られた外装容器に格納することが望ましい。輸送に長時間がかかる場合には、適切な温度範囲を維持できることが保証された容器で輸送すること。

(4)搬送容器

搬送に使用する容器については、細胞製剤の状態（室温・凍結保管等）や移動距離（院内なのか、遠距離なのか）により異なるが、目的地に到着して管理が引き継がれるまで「細胞製剤の品質」を担保する性能を有していることが重要である。移動中の温度記録を連続的に取ったり、搬送バリデーションを繰り返し行ったりすることで、使用する容器が目的を果たしているか、十分に確認することが重要である。

環境管理

細胞調製を行うゾーンの空気清浄度をどのように設定するかは、各施設での作業内容に応じて決定する必要がある。例えば、開放系の作業を行う安全キャビネット内をグレード A に担保するためには、グレード B の調製室が必要となる。しかし、閉鎖系の場合、あるいは、アイソレーターを使用する場合には周辺環境にそこまでの高いグレードは要求されない。調製室のグレードに応じて、環境管理の方法が事細かに異なるため、詳細は成書を参考にされたい。

室温管理については、細胞調製室は、冷蔵庫・遠心機等の発熱する機器が設置されている場合、作業中に暑くなることもある。作業するには快適作業温度を提供するため、室温を若干下げて設定した方が作業効率の向上が見込める。また、環境菌（浮遊菌・付着菌）の増殖を抑える意味でも室温は少し下げて適切な温度（例えば 20℃前後）で管理すると良い。

一方で、湿度は、環境菌（特にカビ）のことを優先に考えると極力乾燥状態にしたいが、静電気によってホコリが付着してクリーン環境の維持が難しくなる場合がある。また、作業者の労働環境を考慮すると作業に影響の無い適切な湿度（例えば 50%前後）に設定することが望ましい。

これらの温度、湿度、および必要に応じて空気清浄度、表面汚染など環境管理を行ったデータを記録する記録様式を定め、記載する。リアルタイムにモニタリングを行うことも有用

である。休日・夜間に環境管理に逸脱があった場合にもすぐ対応できるよう、予め当番者を決めておくことが望ましい。

機器管理

細胞調製を行うための機器は、安全キャビネットおよびクリーンベンチ、冷却遠心機、冷凍冷蔵庫、保存用超低温冷凍庫、液体窒素タンク等がある。このような機器については、点検も含む使用手順書(マニュアル)や日常・使用前・定期点検記録等の文書類を整備する。

このうち、日常点検は、細胞処理の品質に影響を及ぼす可能性を鑑みて、常時監視を実施するか、あるいは、始業終業時点検を行うか、事前に手順書で規定する。

使用前点検は、作業者が使用する設備機器について使用前に異常がないかを確認する点検である。点検項目などの詳細は各機器の取扱い手順書、または製造や品質試験手順書にて定め、適切な点検が実施できるよう教育訓練を実施する。

定期点検は、いわゆる保守点検(メンテナンス)であり、細胞調製を実施する際に重要な機器については、年に1回程度の点検が必要である。点検内容に関しては、各機器メーカーで種々の項目が規定されており、外部委託することも多い。

いずれの点検も、その実施と内容を記録書として残すことが重要である。

(執筆者:新井康之、長村登紀子、査読者:上田恭典)

第5.2章 細胞処理の基本的操作

はじめに

ヒト由来細胞を用いる治療を細胞療法といい、そのために行う作業を細胞処理という。細胞処理の手技は歴史的には造血細胞移植の普及に伴って確立、普及してきた(表1)。また近年使用が拡大している CAR-T(キメラ抗原受容体 T 細胞)細胞療法においても、製品によっては原材料となるリンパ球の細胞処理、また、製剤の分注などの操作が必要である。

日本骨髄バンクを介した非血縁者の造血幹細胞採取では、「移植に用いる造血幹細胞の適切な提供の推進に関する法律(平成24年法律第90号)」および関連省令(省令第138号および139号)に従う必要がある。血縁者間、自家移植にはこの法律は適応されないが、日本輸血・細胞治療学会および日本造血細胞移植学会が共同で策定した「院内における血液細胞処理のための指針」に準じて、各施設の設備を含めた環境(インフラ)と運用(手順)を改良していくことが求められている。さらに、「再生医療を国民が迅速かつ安全に受けられるようにするために施策の総合的な推進に関する法律(平成25年法律13号)」が施行され、造血幹細胞移植のルーチン以外の細胞治療における細胞治療用製品に関しては、Good Manufacture Practice (GMP)に代わる新たな基準として再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準(Good Gene, Cellular, and Tissue-based Products Manufacturing Practice; GCTP)が適応されることとなっている。また、日本輸血・細胞治療学会および日本造血細胞移植学会が共同で運営する「細胞治療認定管理師」制度において、細胞処理の基本的操作やその背景にある基礎的な生物学の知識を習得しておくことは非常に重要である。

細胞ソース	適応	細胞処理種類
骨髄	血液型主不適合時(Major mismatch) 例:患者 O 型、ドナー A 型	単核球分離(赤血球除去)
	血液型主/副不適合時(Major/Minor mismatch) 例:患者 A 型、ドナー B 型	単核球分離+血漿除去
	血液型副不適合時(Minor mismatch) 例:患者 A 型、ドナー O 型	血漿除去
	同種骨髄血保存(新型コロナウイルス感染症に伴う特別対応)	単核球分離(+血漿除去)+凍結
	自家骨髄移植	単核球分離+凍結
末梢血幹細胞	血液型不適合時(Minor mismatch)	血漿除去
	自家末梢血幹細胞移植	凍結
ドナーリンパ球輸注	血液型副不適合時(Minor mismatch)	血漿除去
臍帯血	凍結保存	HES 法分離 ³⁾ による赤血球減量
	副作用等で DMSO を洗浄したい場合	アルブミンデキストラン希釈洗浄 ⁴⁾

顆粒球輸注	血液型副不適合時(Minor mismatch)	血漿除去
間葉系幹細胞(MSC)療法	投与	解凍・分注
CAR-T 細胞療法	原料リンパ球の採取	凍結
	製剤の調製	解凍・分注

表1 細胞療法における細胞処理¹⁾²⁾

細胞処理後の目標

造血幹細胞移植においては、少ない細胞数での移植は、生着不全や血球回復遅延の危険性が高い。そのため、安全な移植を担保する上で、有核細胞数・CD34⁺細胞数・CFU-GM 数に関して、目標細胞数が掲げられている(表2)。自施設の細胞回収率(処理後/処理前細胞数)から処理後の大体の細胞数、さらには凍結解凍後の細胞数が予測できるようになれば理想的である。

検体	骨髓移植	末梢血幹細胞移植	臍帯血移植(凍結時)
有核細胞数	$2 \times 10^8/\text{kg}$	$4 \times 10^8/\text{kg}$	$2 \times 10^7/\text{kg}$
CD34 ⁺ 細胞数	$2 \times 10^6/\text{kg}$	$2 \sim 5 \times 10^6/\text{kg}$	$1 \times 10^5/\text{kg}$
CFU-GM	$1.5 \sim 2 \times 10^5/\text{kg}$	$1.5 \sim 2 \times 10^5/\text{kg}^{4)}$	$5 \times 10^4/\text{kg}$

表2 各種造血幹細胞移植に必要とする細胞数(理想的目標)^{1) 2) 5)}

CAR-T 細胞療法においては、一部の製品で、製造に必要とする原料リンパ球数が規定されている。患者状態や検査値によって、細胞採取効率を予測した上で、まずは適切な量の細胞採取を行う(血液処理量設定の最適化)。その後、採取細胞数に応じて、規定の範囲内になるよう細胞懸濁液を希釈・濃縮した上、無菌操作によって調製された細胞保存液と混合して凍結作業を行う。

環境

細胞処理にあたっては、「第5.1章 細胞処理の基本」の項を参照されたい。

GMP (GCTP) の基本概念

造血幹細胞移植用や CAR-T 細胞療法に用いる細胞の調製においては、1.人為的な誤りを最小限にする。2.汚染、品質低下の防止、3.品質保証システムの確立の3点をGMP(GCTP)の基本概念として理解することが重要である。これを順守するためには省令や指針に掲げてある多くの事項がある。この中で、特に重要と思われる事項を列記する。

- ①複数の患者の細胞・検体を同じ場所で同時に扱わない。
- ②取り違い防止のために確実にラベリングを行う。

- ③細胞調製や検査に使用する試薬・消耗品の有効期限を確認する。特に検査試薬は忘れがちである。
- ④細胞調製の方法についての基本的な清潔操作の教育を実施する。国内では報告がないが、海外では移植用骨髄液、末梢血幹細胞移植細胞での細菌・真菌汚染率は0～1.3%^{6),7)}である。例えば、汚染を最小限にするためにシリンジは1回の吸引、吐出とするなど、基本操作を教育すること。
- ⑤手順書と工程記録を作成する。
- ⑥部外者の立ち入りを制限するとともに、作業者の安全管理に配慮する。
- ⑦臨床検体専用の場所を決める。特に放射線やUVが照射される場所に置かないこと。特にクリーンルームやパスボックスにUV照明がある場合には注意が必要である(品質低下の防止)。

本テキストを参考に、自施設に即した安全でより品質のよい細胞操作を目指して、各施設での手順を確立されたい。

生細胞数の測定

(1)細胞数の測定

細胞数の測定は、造血細胞移植をはじめとした細胞療法において最も基本かつ重要な検査である。細胞処理調製過程や機器の品質管理用や回収率を計算する際のデータとしても使われる。一般に自動血球測定装置による方法と細胞を染色して鏡顕して算定する方法がある。

採取された骨髄液や末梢血、あるいは採取された細胞バッグ中の細胞総数測定には測定者の誤差を最小限にするために自動血球分析装置(Sysmex, Siemens, Beckman Coulter 社製等)の使用が推奨される。その場合、定期的にコントロール血球にて測定値が正しいか測定装置そのもののバリデーションを行っておくことが重要である。ただし、こうした機器は、本来、末梢血を測定するものであって、それ以外の検体は、本来適切な対象検体でない。とりわけ骨髄血においては、幼若血小板、凝集塊、脂肪滴や赤芽球系細胞を多く含むため¹⁾、細胞総数および分画ともに、表示された結果の解釈には注意が必要である。その他の自動血球分析装置の一般的な特徴として、必要最低限のサンプル量や至適細胞濃度が機種によって異なっている。特に、濃度が高すぎると白血球分画が正しく算出できないため、適宜量を調製・希釈する必要がある。なお、生細胞と死細胞の区別ができないことにも注意する。さらには、測定には、電気抵抗変化を利用しているものと、レーザー光散乱を原理としているものがあり、それぞれの器機の性能を十分理解して使用する。例えば、骨髄や臍帯血など有核赤血球を多く含むサンプルでは、それを鑑別できる機種(レーザー光散乱)を使用することが望ましい。

一方、細胞分離後クリーンルーム内で細胞数を測定したり、解凍後に生細胞率を測定したりする場合には色素により白血球を染色し目視で算定する方法が用いられる。染色

した細胞液を血球計算盤とカバーガラス上にできた高さ 0.1mm の部分に注いで顕微鏡で数を数える。血球計算盤(Hemocytometer)にはビルケルチュルク(Burker-Turk)や改良ノイバウエル(Improved Neubauer)が一般的に用いられる。ニュートンリングを作るように計算盤にカバーガラスをスライドさせてかぶせると深さが 0.1mm になる。ディスポーザブル計算盤や検査キットも市販されていて便利である。染色には、トリパンプルー (Trypan Blue) 染色、チュルク氏液 (Turk's solution) 染色が一般的に用いられ、安価であるが、特殊な例ではエチジウム・ブロマイド/アクリジン・オレンジ (Acridine Orange/Ethidium Bromide) 染色やアクリジン・オレンジ/PI (Propidium iodide) 染色を用いることもある。トリパンプルー法は、トリパンプルー色素が生細胞には取り込まれないが死細胞では取り込まれることを利用して、生細胞と死細胞を見分けるときに役立つ。生細胞は光って見えるが、死細胞は青色に染まる。ただし赤血球にも取り込まれないため赤血球が多い検体では白血球との判別がつかない場合がある。一方、チュルク法は骨髓液や末梢血など赤血球が多くて白血球との見分けがつかない新鮮な検体の場合に用いる。チュルク液を入れると赤血球が溶血するが、どの白血球も濃紺に染まって見えるので死細胞との区別はつかない。死細胞も含み、かつ赤血球も多い場合にはエチジウム・ブロマイド/アクリジン・オレンジ染色法やアクリジン・オレンジ/PI 染色が有用である。臍帯血解凍時の生細胞率測定の際に用いられることが多いが、蛍光顕微鏡を必要とする。近年、公的臍帯血バンクではフローサイトメリーにて CD45 陽性細胞分画および CD34 陽性細胞分画の 7AAD 陰性細胞率を計算する方法が用いられている。

(2) 適応

総有核細胞数	自動血球分析装置	総白血球数(または有核細胞数)を測定。機種によっては分画も可能。方法は各機種のマニュアルに準じる。 骨髓、末梢血幹細胞採取時の患者/ドナー末梢血、末梢血幹細胞採取時産物、臍帯血
	チュルク	総有核細胞数を測定。
生細胞数	トリパンプルー染色法(TB) エチジウム・ブロマイド/アクリジン・オレンジ染色法(EB/AO) フローサイトメリー法 (CD45/7AAD・AO/PI 染色)	生細胞率、生細胞数を測定 凍結解凍臍帯血、解凍骨髓・解凍末梢血幹細胞、解凍骨髓、解凍末梢血幹細胞

表 3 細胞数測定とその対象

(3) 方法

1) チュルク氏液染色とビルケルチュルク血球計算盤の使用手順⁸⁾

①表4に従い、必要物品を準備する。

品名	個数
チュルク氏液(チュルク液)/0.3～0.5%トリパンブルー液	適量
ビルケルチュルク血球計算盤またはディスポーザブル計算盤	1枚
カバーガラス	1枚
顕微鏡	1台
ピペッター(P20 またはP10)、ピペッター(P100 または P200)	各1
チップ(Yellow tip)	適量
96 穴U字型プレート(マイクロチューブでも可)	1

表4 必要物品

②検体(細胞浮遊液)をよく攪拌またはピペッティングする。

③ビルケルチュルク血球計算盤にカバーガラスを計算盤にのせ、ニュートンリングを作りながらスライドさせる。ニュートンリングができた状態では深さが 0.1mm となる。その枠のクレンメを閉じると高さが 0.1mm になるセットもある。カバーセットにより、ニュートンリング形成が不要な計算盤もある。

④96 穴-U 字型プレートの 1 穴に 0.4% (w/v) チュルク液をマイクロピペットで 90 μ L 採り、良く攪拌した検体(細胞浮遊液) 10 μ L を加えて良くピペッティングする(=10 倍希釈)。検体とチュルク液の希釈比は、チュルク液の添付の至適希釈倍率とすることが望ましい。検体の希釈倍率は、事前に各自調整すること。自動血球分析装置等の結果をもとに約 1,000/ μ L に調整すると、各視野が 100 程度となる。

⑤チュルク液/細胞浮遊液混合液 10 μ L をピペッターで、血球計算盤の片方又は両方の枠(チェンバー)に入れる。このときチップの先端をカバーガラスの端に注意深く触れさせると、各チェンバーが毛細管現象により満たされる。チェンバーを満たす量は多過ぎてても少な過ぎててもいけない。

⑥区画 A から四隅の 1 mm² 区画内の全細胞を数える(図 1A、B)。濃紺色に見える細胞を数える(チュルク液では生・死細胞の区別はできない)。

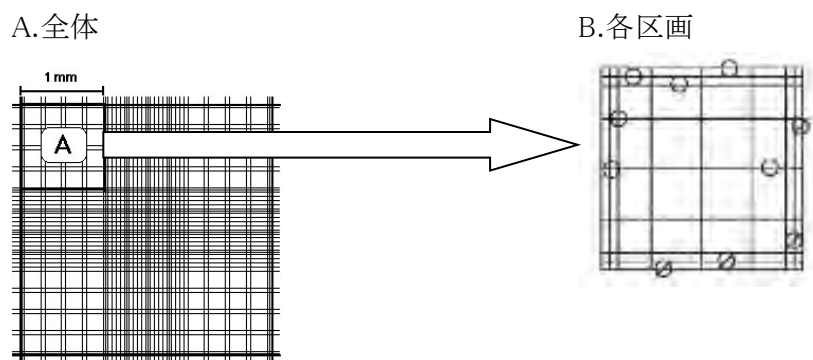


図1 血球計算盤

Aで示した大区画は一辺 1mm 面積 1mm^2
同じ面積を右上、右下、左下と大区画4つを数える。

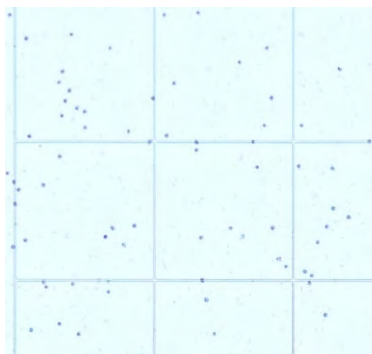


図2 チュルク染色の実際の顕微鏡写真

注1) 各区画(図 1B)の境界の中央線に触れている細胞のうち、上側と左側にあるものは数え、下側と右側にあるものは数えない。

注2) 塊を形成している細胞が 10%を超える場合、チュルク/細胞浮遊液混合液だけでなく元の細胞浮遊液も十分にピペッティングを行ない、細胞が拡散していることを確認し全ての手順をやり直す。各 4 大区画内が、100 個程度が理想の希釈である。多い場合には適切な希釈係数に調節し直す。また精度を保つため新しいサンプルを用いて計数の手順を繰り返す。

⑦細胞密度と総細胞数を計算する。各区画(図 1B)のカバーガラスとの間にできた空間の容積は $10^{-4} \text{ cm}^3 (=0.1 \text{ mm}^3)$ になる。1 cm^3 は 1 mL に相当するため、1 mL 当たりの細胞密度と総細胞数は以下の式で算出する。

1 mL 当たりの細胞数 = 1 区画の平均細胞数 $\times$ 希釈係数 $\times 10^4$

例) 4 区画の合計が 200 個 (1 区画の平均細胞数 = 50) の場合、

$200 \div 4 \times 10 (\text{希釈倍数}) \times 10^4 = 5 \times 10^6 / \text{mL}$

総細胞数 = 1 mL 当たりの細胞数 $\times$ 検体細胞浮遊液の元の容量

例) $5.0 \times 10^6 (/ \text{mL}) \times 120 \text{ mL (元の容量)} = 6.0 \times 10^8$ 細胞

2) チュルク氏液染色とビルケルチュルク血球計算盤の使用手順⁸⁾

①表 2 に従い、必要物品を準備する。

②検体(細胞浮遊液)をよく攪拌またはピペッティングする。

③ビルケルチュルク血球計算盤にカバーガラスを計算盤にのせて、セットする。

④96 穴-U 字型プレートの 1 穴にトリパンプブルー液をマイクロピペットで $10 \mu\text{L}$ 採り、良く攪拌した検体(細胞浮遊液) $10 \mu\text{L}$ を加えて良くピペッティングする(=2 倍希釈)。検体とトリパンプブルーの希釈比は、トリパンプブルーの添付文書の至適希釈倍率とする

ことが望ましい。検体の希釈倍率は、事前に各自調整すること。自動血球分析装置等の結果をもとに約 1,000/μL に調整すると、各視野が 100 程度とすることが推奨される。

⑤トリパンブルー液/細胞浮遊液混合液 10～20 μL をピペッターで、血球計算盤の片方又は両方の枠(チェンバー)に入れる。このときチップの先端をカバーガラスの端に注意深く触れさせ、各チェンバーが毛細管現象により満たされる。チェンバーを満たす量は多過ぎても少な過ぎてもいけない。

⑥区画Aから四隅の 1 mm² 区画内の全細胞を数える(図 1)。死細胞は青色に染色。生細胞は光って見える。生細胞と死細胞は別々に数える。注意点は、チュルク液染色の項参照のこと。

⑦細胞密度と総細胞数を以下の式で算出する(前項参照)。

$$1\text{mL 当たりの細胞数} = 1 \text{ 区画の平均細胞数} \times \text{希釈係数} \times 10^4$$

⑧生存率の計算

$$\text{生細胞率}(\%) = \text{生細胞の総数} \div \text{総細胞数} \times 100$$

例) 1 区画における生細胞の平均数が 80、死細胞数の平均が 20 の場合

$$\text{生細胞率}(\%) = 80 (\text{生細胞}) \div (80 + 20) (\text{生細胞} + \text{死細胞}) \times 100 = 80\%$$

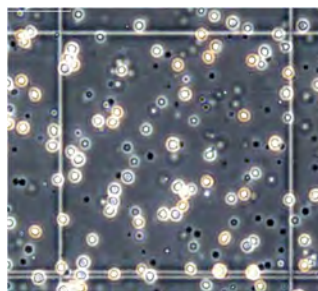


図 3 トリパンブルー染色の実際の顕微鏡写真

3) エチジウム・ブロマイド/アクリジン・オレンジ染色法⁹⁾

(赤血球が多い検体でかつ解凍検査のための生細胞率測定法)

①グローブを着用し、試薬の準備をする。

・原液(100 倍): 1mL の 95%エタノール溶液に Ethidium Bromide 50mg と Acridine Orange 15mg を溶解し、49mL の蒸留水を加え、よく混合する。1mL ずつ分取し -20℃で凍結保存しておく。

・染色液(1 倍): 1mL の原液(100 倍)を PBS で 100 倍希釈する。よく混合し、4℃で保管する。使用期限は 1 ヶ月間である。

注)エチジウム・ブロマイドとアクリジン・オレンジは発ガン性物質である。グローブを着用して使用し、試薬の取り扱い及び廃棄には十分注意する。

②機器の準備: 蛍光顕微鏡のランプを点け、血球計算盤、及びカバーガラスも準備しておく。

- ③サンプル(細胞懸濁液)をPBSで適宜希釈する。白血球数が約 $1 \times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{L}$ が理想。測定サンプル $25 \mu\text{L}$ に対して、 $1 \times$ 染色液 $25 \mu\text{L}$ を混合する(等量混合)。
- ④血球計算盤へ混合液を注入し、蛍光顕微鏡で測定する。
- ⑤蛍光顕微鏡は、はじめに可視光で100～400倍にて細胞を観察し、計算盤の各区画がはっきり分かるように、調節する。
- ⑥可視光を点灯したまま、蛍光のスイッチを入れ、細胞を観察する。生細胞はミドリ色(アクリジン・オレンジ)、死細胞はオレンジ色(エチジウム・ブロマイド)として観察される。
- ⑦ミドリ色とオレンジ色を区別してカウントし、記入用紙に記録する。図1Aの区画Aから四隅の 1mm^2 区画内の全細胞を数える。
- ⑧以下の計算は、トリパンブルー染色と同様である。

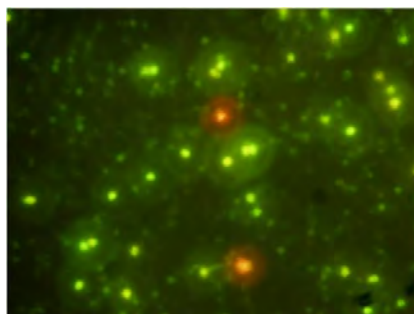


図4 エチジウム・ブロマイド/アクリジン・オレンジ染色の実際の顕微鏡写真
生細胞はミドリ色(アクリジン・オレンジ)・
死細胞はオレンジ色(エチジウム・ブロマイドが細胞内に入り核を染める)

4) フローサイトメトリーによる生細胞率の算出方法

CD34 陽性細胞数を測定するときに合わせて実施する。詳細は、「第4.3章 CD34 陽性細胞数の測定」の項を参照されたい。例えば、CD45/7AAD 染色であれば、図5に示すように、CD45 陽性細胞数(R3)分画の死細胞数(R7; 水色)を除いた数を生細胞率とする。好中球分画では死細胞(水色)が多いことがわかる。CD45 または CD34 陽性分画のうち、7AAD 陰性細胞比が生細胞率となる。

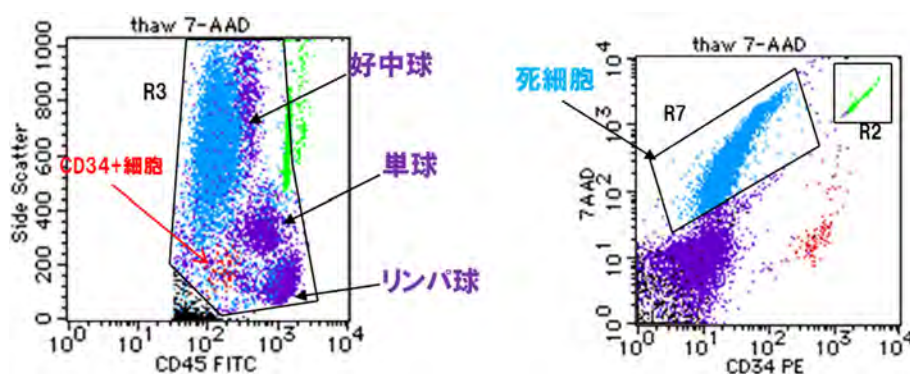


図5 CD34 陽性細胞測定時のフローサイトメトリー図

参考文献

- 1) Technical Manual Committee V-TV. Technical Manual AABB (日本語版). 13th ed. AABB; 2002. p.569-600.
- 2) 神田善伸. 造血幹細胞移植診療マニュアル. 日本医学館; 2006. p.23-7.
- 3) Cord blood transplantation and haematopoietic precursor cells. Vox Sang. 2005;89:172-6.
- 4) Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92:10119-22.
- 5) Lasky LC JN. Quality assurance in marrow processing. In; A Manual of Current Techniques. Philadelphia: FA Davis; 1992. p.386-443.
- 6) Sacher RA. Bone marrow processing for transplantation. Bone marrow and stem cell processing: A Manual of Techniques. Philadelphia: FA Davis; 1992. p.1-16.
- 7) Webb IJ, Andersen JW, et al. Sources and sequel of bacterial contamination of hematopoietic stem cell components: Implications for the safety of hematotherapy and graft engineering. Transfusion. 1996;36:782-8.
- 8) 臨床検査法提要. 改訂第33版 金原出版株式会社
- 9) “Viability Staining Using Ethidium Bromide and Acridine Orange” From Cytometry Source Book: Becton Dickinson Immunocytometry Systems.

(執筆:長村登紀子、新井康之、査読:尾上和夫)

資料

移植サンプル検査工程記録(例)

Inspection Processing Record of Thawed unit for transplantation			
ドナー番号 Donor ID		患者 ID/氏名	
		実施検査項目 Items of inspection 血球計算 CBC・白血球生存率 Viability・ コロニーアッセイ Colony・CD34 ⁺ /CD3 ⁺ FACS	
検査日 Date of Inspection		希釈倍率 Dilution	
Date yy/m/dd / /		サンプル量 × B: (倍)	
Volume of TRANSPLANT/TRANSFUSION unit		A: ml	

*各細胞数濃度/μl × Volume (unit) = Total Unit 細胞数/ Unit である。

血球計算 CBC 実施記録者氏名 Execution/Record person Name :

使用血球計算機 Equipment	Symex XE ,Others()	有核細胞濃度 NC Concentration	C:実測値 × B = x10 ³ / μL
Calculation Formula	C × A × 10 ³ = x 10 ⁸ cells/Unit		

生存率測定 Viability 実施記録者氏名 Execution/Record person Name :

測定開始時 Start time	Time: 時		染色液 Staining Lot No.		
	W 1	W 2	W 3	W 4	合計 sum
生存細胞 Viable (緑 green)					
死細胞 Dead (橙 Orange)					
D:生存率 Viability (生存細胞濃度 viable conc.) / (生存細胞濃度 viable + 死細胞濃度 dead) × 100 = %					

C F U播種 Colony plating 実施記録者氏名 Execution/Record person Name :

培地名 Name of medium	製造元 Company		Lot.No.
MethoCult GF H4434V	ベリタス Vellitas		
管理番号 Control No.	ピペット 10 μL	クリーンベンチ	CO2 インキュベーター
D01		輸血部(〇〇)	輸血部・その他()
播種量 (〇つける) Plating volume	___ μL・___ μL		

C F Uカウント CFU count 実施記録者氏名 Execution/Record person Name :

カウント日 Date of Counting	Mm/dd: /			
	BFU-e	CFU-GM	CFU-Mix	Total
播種量 μL				
① (個/dish)				
② (個/dish)				
E:濃度 Conc. (個/μL) (①+②) × 2.75/2 / 播種量 × B				
F: Total CFU ExA × 10 ³				

ドナー番号 DONOR ID

CD34⁺細胞 CD34+cell 染色実施 Staining 記録者氏名 Name:

測定実施 Measurement 記録者氏名 Name:

Lot No.	TRUCOUNT Tube	CD34Antibody	CD3Antibody	Lysing Sol. (Pharm lyse)
Lot No.	CD4/8 Antibody	7-AAD		
管理番号 Control No.	1%γγγt Pinet 20μL	1%γγγt Pinet 200μL	1%γγγt Pinet 1000μL	FACS測定機
染色開始日時 Staining start date d/h 日 時	Beads count/TruCount tube	Sample 添加量 Sample Addition 100 μL		
測定日時 Measurement date d/h 日 時	解析日 Analysis date Mm/dd: /	希釈倍率 Dilution x x		
Beads count/測定値	CD34 ⁺ 実数/ 測定値中 CD34+ No/ measure	CD34 ⁺ 濃度 CD34+ concentration=F* /μL		
G: Total CD34 F×A×10 ³ =		×10 ⁶ cells/Unit		
	CD3 実数/ 測定値中 CD3+ No/measure	CD3 ⁺ 濃度 CD3+ concentration=CD3c** /μL		
Total CD3 CD3c×A×10 ³ =		×10 ⁷ cells/Unit		
CD4+CD8- %	CD4-CD8 +%	CD4-CD8- %	CD4+CD8+ %	CD4+ total: Total CD3×(CD4+CD8-%)= ×10 ⁷ cells/Unit
				CD8+ total: Total CD3×(CD4-CD8+%)= ×10 ⁷ cells/Unit

$$* : \frac{\text{CD34}^+ \text{実数}}{\text{Beads測定数}} \times \frac{\text{BeadsCount / Trucount tube}}{100\mu\text{L}} \times \text{Dilution} = \text{CD34 concentration}$$

$$** : \frac{\text{CD3}^+ \text{実数}}{\text{Beads測定数}} \times \frac{\text{BeadsCount / Trucount tube}}{100\mu\text{L}} \times \text{Dilution} = \text{CD3 concentration}$$

第5.3章 骨髄液の処理

赤血球除去

はじめに

同種骨髄移植において、レシピエントとドナーに ABO 主不適合(表1)がある場合、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レシピエント血漿中の抗体(抗 A, 抗 B 抗体)が結合し、重篤な即時型の血管内容血を起こす可能性がある。また、レシピエントにドナーの赤血球抗原に対する不規則抗体が存在する場合、ドナーの骨髄液に含まれる赤血球抗原と反応し、血管外溶血を起こす場合がある。あるいは、レシピエントが RhD 陰性で抗 D を保有し、ドナーが RhD 陽性の場合、ドナーの骨髄液に含まれる RhD 陽性赤血球がレシピエントの抗 D と反応し、血管外溶血を起こすことが考えられる。同様に、レシピエントが Rh D 陰性で抗 D を保有していない場合においても、骨髄液に含まれる RhD 陽性の赤血球によって感作され、抗 D 抗体が産生される可能性は否定できない。これらの組み合わせの不適合同種骨髄移植を行う場合、ドナーの骨髄液から赤血球を除くことが必要となる。

骨髄液から赤血球を除去する方法には、大別して機器を用いる方法^{1)~3)}と手作業を含む用手法の2つがある。しかし、近年は遠心型血液成分分離装置(以下、血液成分分離装置)が中心で行われている。本邦で赤血球除去に用いられている代表的な血液成分分離装置には、閉鎖回路で汎用性がある Spectra Optia™(TERUMO BCT 社)(図1A)と COM.TEC™(FRESENIUS KABI 社)(図1B)の2機種がある。また、赤血球の混入が少ない Ficoll 液を用いたコンパクトな自動細胞分離装置の SEPAX™(cytiva 社)などもある⁴⁾。一方、用手法には Ficoll 液を用いた比重遠心法⁵⁾と赤血球沈降促進剤の hydroxyl ethyl starch (HES)⁶⁾を添加し赤血球除去する方法がある。我々はドナー骨髄液中の不適合赤血球を Ficoll 液を用いた用手法で除去し、移植後生着が得られキメリズムを経て完全キメラ(ドナー型)となることを確認している^{7)~9)}。しかし、現在はほとんどの施設が血液成分分離装置を用いて、骨髄液から赤血球除去を実施している。血液成分分離装置を用いる場合は、必ず付属している「骨髄液処理手順書」を参照し、実施することが必須である。また、細胞処理においては「作業工程記録書」「結果報告書」に記載することが重要である。

	ドナー	レシピエント
ABO 主不適合	A	O
	B	O
	AB	O
	AB	A
	AB	B

	ドナー	レシピエント
ABO 主・副不適合	A	B
	B	A

表 1

赤血球除去が必要な ABO 不適合の組み合わせ

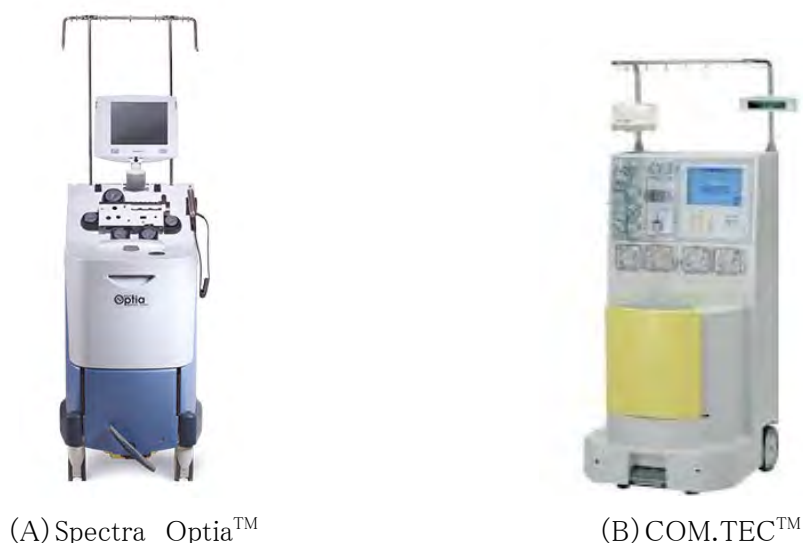


図1 赤血球除去に用いられる血液成分分離装置

血液成分分離装置を用いた赤血球除去

安全に自動化された無菌閉鎖回路にて赤血球、白血球および血漿に分離し、白血球成分の単核細胞層を濃縮採取する代表的な血液成分分離装置2機種(Spectra Optia™、COM.TEC™)を紹介する。血液成分分離装置は、専用の血液回路を装着して使用する装置である。コンピューター制御されたポンプ、バルブ、センサー及び遠心分離器により血液成分分離工程が進み、血液成分等が専用の血液回路の中を流れ処理される。なお、いずれの機種においても、まず、ディスプレイ・セット等に破損、孔などの不具合などがないことを、所定の手順で確認することが重要である。

(1) Spectra Optia™ (Terumo BCT 社)

1) 骨髓液の BMP バッグへの移し替え(図2)

採取された骨髓液を、骨髓液処理(BMP)セットの BMP バッグに移す。ACD-A液を採取骨髓液総量に対し約10:1の割合で加える。バッグ内赤血球量が125mL未満の場合は、適切な血球分離のため、赤血球を骨髓液に追加する必要がある。

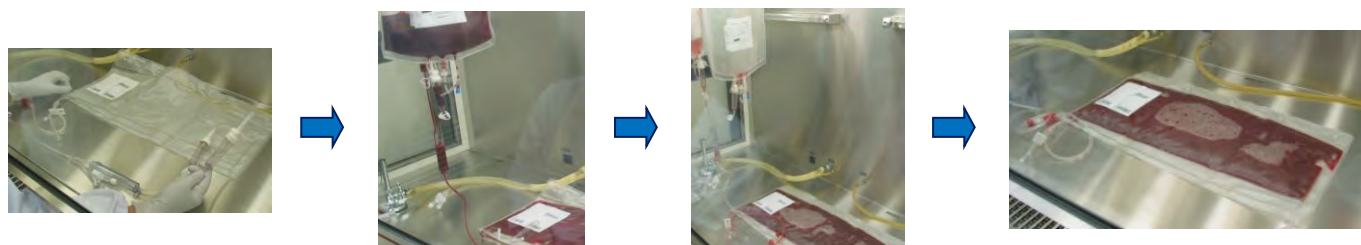


図2 骨髓液濃縮専用(BMP)のセットアップ

2) IDL セットと BMP セットの接続(図3)

機台に IDL セットを取り付ける。遠心分離器へのチャネル取り付け時は、適切な向きできちんとロックされているかを確認する。その後、骨髓液を導入した BMP セットを接続する。その際、IDL セットの採血ラインにエアが入らないよう注意する。

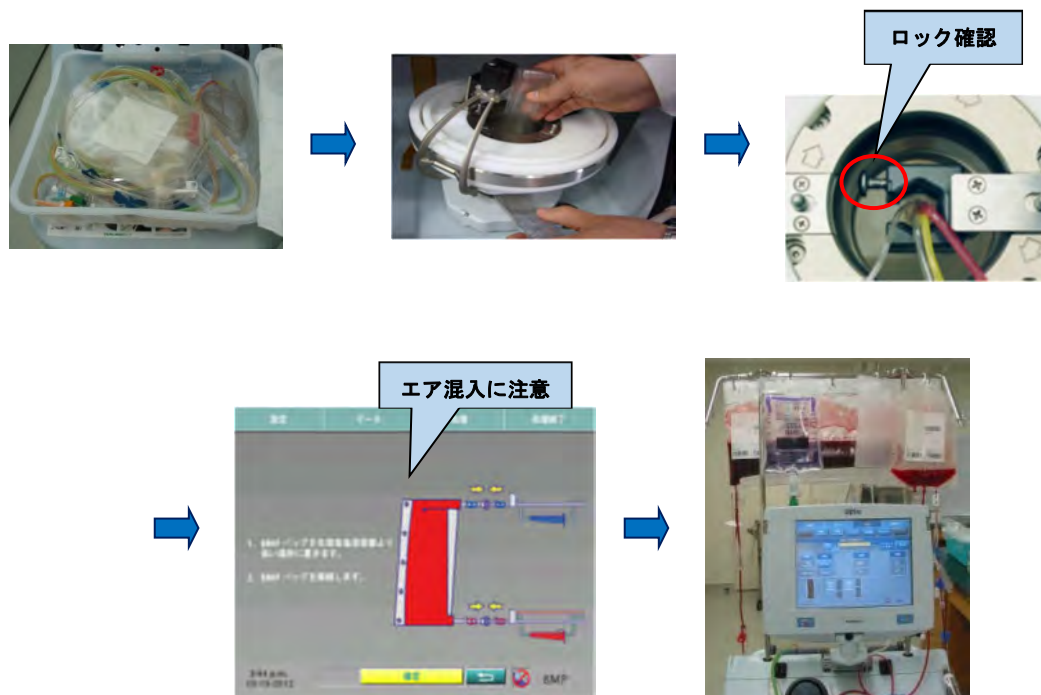


図3 IDL, BMP セット取り付けと処理の開始

＜BMP バッグ接続画面＞

システムの指示に従って1枚の BMP バッグを IDL セットの採血および返血ラインに接続する。

3) 骨髓液の処理

処理前に骨髓液の総量(骨髓液＋希釈液＋ACD)とヘマトクリット値の2項目を Spectra Optia™ に入力するため、測定の必要がある。インターフェースの形成は自動で行われる(図4)。形成後は、採取プリファレンス(図5)を変更して採取成分を調整することができる。採取プリファレンスとは、バフィーコート(血小板と白血球の層)から血球を採取する深さを微調整するためのものである。採取プリファレンスを上げることで採取物には血漿(血小板)が多く混入し薄い赤色となり、下げることで赤血球がより多く混入し濃い赤色となる。システムが採取ポートに血球を検出すると、自動的に採取バルブが採取位置に移動する。手順中は、適宜 BMP バッグ内の成分を静かに混和する。最終の分離細胞採取量は骨髓液の約 1/10 になる。

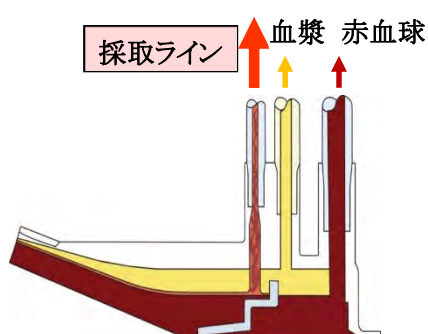


図4 遠心槽内のインターフェース¹⁰⁾

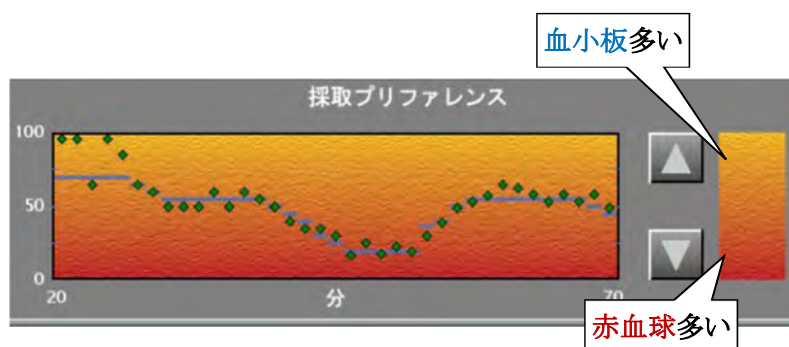


図5 採取プリファレンス

4) 処理の完了

処理目標が達成されると、処理終了画面が表示される。セットの取り外し後、実施した手順の要約が画面に表示される。手順データは終了後も最大 100 件までシステムに蓄積される。処理終了後、ディスプレイを取り外して廃棄し、残液バッグは濃縮後の細胞数が出るまで、廃棄せず保存する。

5) 保守・点検¹⁰⁾

使用者による保守・点検は、クリーニング等の日常保守及びメーカーによる定期点検は必ず実施すること。詳細については取扱説明書の該当部分を参照すること。

しばらく使用しなかった機器を再使用するときには、使用前に必ず機器が正常にかつ安全に作動することを確認すること。必要であればメーカーによる点検を実施すること。

業者による保守・点検は、使用者と業者間に保守契約等個別契約がある場合、その契約内容に基づき実施すること。

(2) COM.TEC™ (FRESENIUS KABI 社)

1) 骨髓液の BMSC ツインバッグセット、分離チャンバー部、専用回路 P1Y

無菌的に採取された骨髓液をツインバッグの片方に移す(図 6)。血液回路の分離チャンバー(図 7)を専用のチャンバー固定部にセットし、この部分を回転させることにより G フォースを作り出し骨髓液を各成分毎に分離する。本体には専用回路キット P1Y を使用する(図 7)。



図6 BMSC ツインバッグ

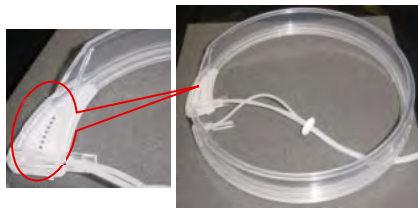


図7 シングル分離チャンバー



図8 専用回路 P1Y セット

2) 本体へのセット取り付け・骨髓液の処理開始(図9)

本体に BMSC ツインバッグを上下フックに吊るし、P1Y セットおよび分離チャンバーを取り付ける。プライミング後、骨髓液を回路内で連続的に循環させる。骨髓液全量を約4～5回処理する。

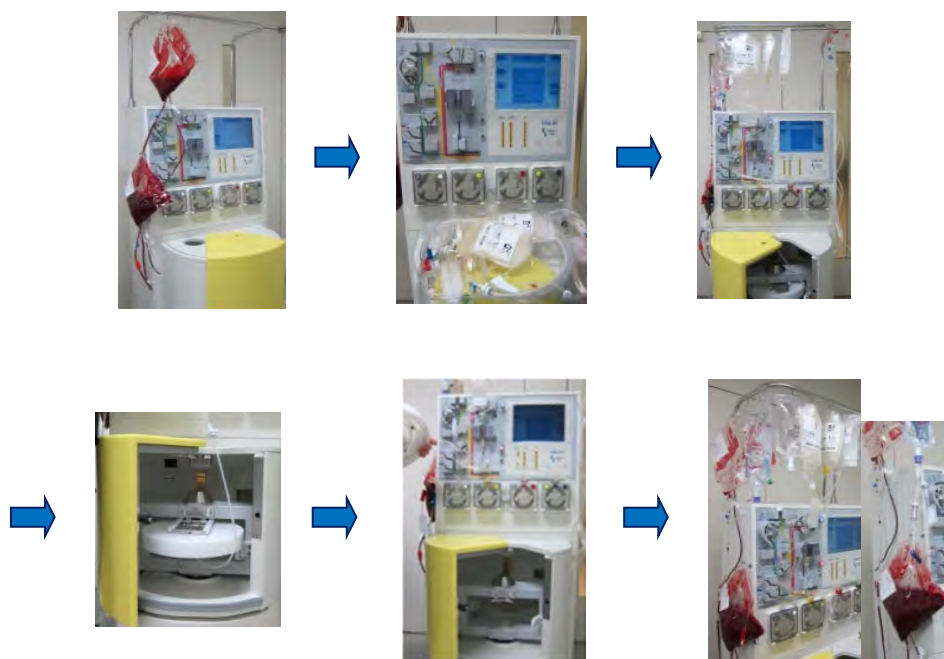


図9 本体へ各セット取付け・処理開始

3) 遠心チャンバー内成分分離(図10)

分離チャンバー内に骨髓液が流入すると遠心力で回路の外側に比重の重い成分の赤血球層が形成され、回路の内側には血漿成分が形成して、バフィーコート層以外の成分はそれぞれのポートより流出する。

赤血球層と血漿層の間に単核細胞層いわゆるバフィーコートが形成され蓄積される。光学的センサーにて随時モニターしており、バフィーコートが流失するのを防ぐ。

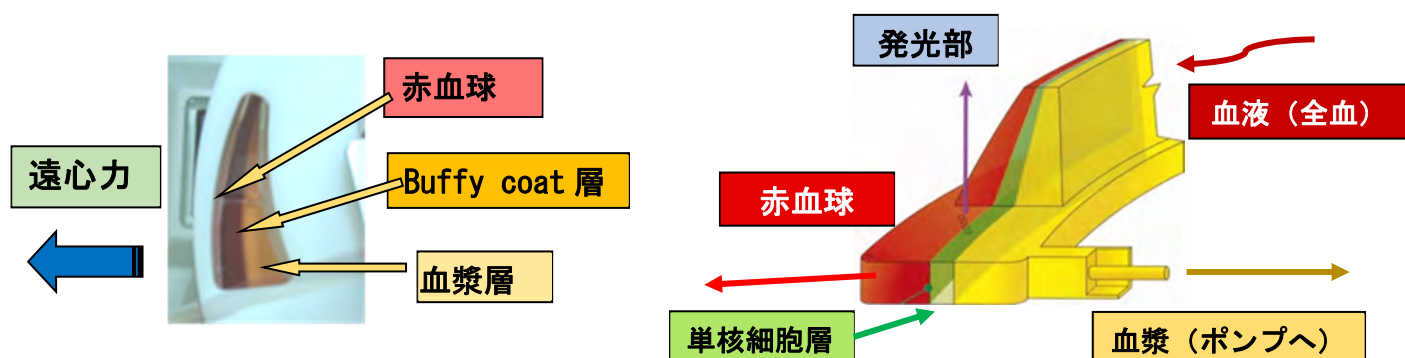


図10 分離の原理¹¹⁾

4) 骨髓液の処理(下記1～3の分離プロセスを実施する)

<1. セパレーション Phase>

骨髓液がチャンバー内に流入し、バフィーコートを形成し、血漿・赤血球成分は返血バッグに戻る。

<2. スピルオーバーPhase>

蓄積したバフィーコートを回収するため、血漿層が戻る。

<3. コレクション Phase>

Stop Phase ボタンを押し蓄積したバフィーコートを回収バッグに回収する。
最終量は、約 40～60mL となる。

5) 処理の完了

処理終了後、操作マニュアルに従いディスプレイを外し廃棄する。残液バッグは濃縮後の細胞数が出るまで、廃棄せず保存する。

6) 保守・点検¹²⁾

本体及び部品は必ず定期点検を行うこと。少なくとも1年に1回または100時間ごとに(いずれか早いほう)指定のサービススタッフによる検査を推奨する。

回路図、スペア部品リスト、解説、調整説明書、その他の書類が必要な際には販売業者に請求すること。また、それらの資料は適切な資格をもった専門スタッフの参考資料としてのみ使用すること。尚、保守作業については販売業者へ連絡すること。

しばらく使用しなかった本体を再使用する際には、使用前に必ず本体が正常かつ安全に作動することを確認すること。本品を6ヶ月以上使用していない場合は、内蔵電池の充電を行うこと。標準的な充電時間は、商用電源に接続し、電源を投入した状態で10時間程度必要とする。故障した際は販売業者に連絡すること。

(3) 安全対策¹²⁾¹³⁾

2021 年 7 月の骨髄バンクの安全情報より、「骨髄液濃縮処理後に細胞回収率が低いことが判明し、残液バッグの再処理により追加輸注を行った事例について」の事例報告があった。原因は不明であった。今後の対策としては、濃縮後の細胞数が出るまで、残液バッグを廃棄せず保存することが重要である。

2021 年 12 月には、骨髄バンクの安全情報より、「骨髄濃縮時の回路破損に骨髄液漏出」の事例報告があった。原因は、機器への回路の取り付け不具合により、濃縮処理開始後、回路の一部に一定の圧がかかり、回路が破損・漏出したと考えられている。このような対策としては、回路取り付け時のチェックリストを作成することが必須であり、担当者で共有し注意喚起することが重要である。

参考文献

- 1) Austin, C, FenFen, H, Michael B, et al. Red Cell Depletion of Major ABO Incompatible Bone Marrow Hematopoietic Progenitor Cells HPC(M) with the Spectra Optia®. Ann Clin LabSci. 2020;50:781-789.
- 2) Yuichi S,Nobuharu F,Keiko F,et al. Red blood cell depletion in small-volume bone marrow processing using manipulation with third-party red blood cells: A comparison of the performance of the COBE spectra and the spectra Optia systems. Transfusion 2022;62:1829-1838.
- 3) Gala A M , José LA, Cristina A, et al. ABO-mismatched marrow processing for transplantation: Comparative results of 80 procedures performed with Cobe Spectra and Spectra Optia.Transfus Apher Sci 2019;58:326-331.
- 4) 岸野光司, 中木陽子, 小野崎文子, 他. 移植のために採取された骨髄液から自動細胞分離 SEPAX™ を用いた単核細胞の分離. 日本輸血細胞治療学会誌 2012;58:456-62.
- 5) Dragani A, Angelini A, Iacone A, et al. Comparison of five methods for concentrating progenitor cells in human marrow transplantation. Blut 1990;60:278-81.
- 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. 1985;48:89-104.
- 7) 岸野光司, 室井一男, 中木陽子, 他. ABO 不適合骨髄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 2002;48:335-41.
- 8) 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. 2002;26:13-7.
- 9) 岸野光司, 中木陽子, 森政樹, 他. ABO 不適合造血幹細胞移植における ABO 遺伝子型を用いた移植片の生着確認の有用性. 医学検査 2007;56:1551-5.

- 10) 血液成分分離装置 Spectra Optia™ 取扱説明書. テルモ BCT 株式会社. 東京. 2018.
- 11) 血液成分分離装置 COM.TEC™ 取扱説明書. 株式会社リレート. 東京. 2008.
- 12) 日本骨髄バンク医療委員会. 骨髄液濃縮処理後に細胞回収率が低いことが判明し、残液バッグの再処理により追加輸注を行った事例について. 安全情報. 2021.
- 13) 日本骨髄バンク移植調整部. 骨髄濃縮時の回路破損に骨髄液漏出. 安全情報. 2021.

血漿除去

はじめに

骨髄液からの血漿除去は、主として骨髄液中に含まれる抗体を除去する目的で行われる。前項で、同種骨髄移植において、レシピエントとドナーに ABO 主不適合(メジャーミスマッチ)がある場合に、ドナーの骨髄液から赤血球を除くことが必要となることを述べた。これに対して、血漿除去の主な対象となるのは、レシピエントとドナーに ABO 副不適合(マイナーミスマッチ)(表 1)の場合である。また、ドナーが不規則抗体を有していて、患者がその抗体に反応する抗原を持つ場合や、ABO 血液型同型の場合でも、骨髄の輸注時に中等度以上のアレルギー反応などの有害事象が出現し血漿成分を除きたいときや、患者の心機能低下などにより容量負荷を避けたい場合などに輸注量を減らす目的で行われることもある。

	ドナー	レシピエント
ABO 副不適合	O	A
	O	B
	O	AB
	A	AB
	B	AB

表 1 血漿除去が必要となる ABO 副不適合の組み合わせ

方法

骨髄液を遠心分離することにより細胞成分と上清を分離して上清(血漿)を除去する。その方法として、血液バッグに分取してバッグ用遠心機で遠心し用手法で上清を除去する方法と、閉鎖系自動細胞調製システムを使用して閉鎖回路で分離する方法があるが、本稿では現在臨床現場で一般に広く実施されているバッグ遠心法について述べる。

またバッグ遠心法では遠心分離の回数によって 1 回法と 2 回法とがあるが、遠心分離を 1 回実施するごとに血漿量を 10%程度にまで減量することが可能とされ、通常の ABO 副不適合の同種骨髄移植の際の血漿除去においては、1 回法でおこなわれている。

(1)使用機器、機材

- ①バッグ遠心機、ローター、バケット…血液バッグが遠心できるもの
- ②無菌接合装置(Sterile Connection Device;SCD)、専用ウェハー
- ③チューブシーラー
- ④はかり
- ⑤分離スタンド
- ⑥ペアン鉗子、スライドクランプなどチューブを止めるもの



図1 バッグ遠心機



図2 無菌チューブ接合機(SCD)



図3 分離スタンド(plasma extractor)

(2) 必要物品

- ①分離バッグ(容量に応じて 300mL 用、600mL 用、1,000mL 用など)
- ②バッグ用連結管または輸血セット ③シリンジ
- ④18G 注射針
- ⑤生理食塩液
- ⑥ACD-A 液(250mL)またはヘパリンナトリウム液 5,000 単位 1 本
- ⑦消毒用のアルコール、アルコール綿など

(3) 方法

1) 骨髄液の遠心バッグへの移し替え

骨髄液は通常骨髄採取のセットに含まれる専用の採取バッグに入って届けられるが、このバッグは容量からも耐久性からも遠心分離には適さないため、遠心可能なバッグに移し替える必要がある。骨髄液量に応じて、例えば骨髄量が 1000mL 程度であれば 600mL 用バッグふたつに移し替える。

まず骨髄液のバッグと空の分離バッグを、SCD を用いて無菌的に接合する(図 4)。SCD が使用できない場合は骨髄バッグのポートに空バッグをスパイクして接合しなければならないが、この際はクリーンベンチ内で無菌的に行う。

骨髄液のバッグからバッグへの移す際は、無理に圧力を加えると溶血の原因となり得るため、スタンドなどを用いて落差を利用した自然落下により行う。

2) 遠心の準備

血液バッグ専用のバケットに、骨髄液の入った分離バッグを入れる。このときバッグとバケットの間に緩衝材などを利用して可能な限り隙間を埋めるようにすると、遠心中のバッグのガタつきが抑えられ細胞と上清の分離が良くなる。また、チューブがはみ出さないよう注意する。

バケットをローターにセットする際は、対称となる位置のバケットの重量をしっかりと合わせてバランスをとってからローターにセットする(図5)。



図4 SCDを用いたバッグの接合



図5 遠心機に骨髄液の入った分離バッグをセット

3) 遠心

骨髄液の遠心条件については、根拠となる文献に乏しく各施設で慣例的に条件を定めていることが多い。参考までに血液製剤の遠心条件を調べてみると、重遠心条件で $4,600 \times g$ 、6分¹⁾、や $2,690 \times g$ 、約7分²⁾ など条件に幅があり、これも確固たるものとしては定まっていない。遠心条件については各施設で検証しながら条件設定することが必要である。

ちなみに筆者の施設ではそれぞれ $1,470 \times g$ 、15分で行なっている。温度は 20°C (室温)で、ブレーキは減速の際の境界面の乱れを抑えるため off または最弱とする。

4) 上清の除去

遠心が終わったらバケットから境界面を乱さぬよう静かに骨髄液のバッグを取り出し、分離スタンド(plasma extractor)にかける。境界面を乱さぬよう注意しながら空の分

分離バッグを SCD で繋ぎ、チューブをペアン鉗子等でクランプしてから圧力板のストッパーを外す。問題がなければクランプを少しずつ解除して、空の分離バッグに上清をゆっくりと移していく(図 6)。ギリギリまで上清を除こうとするあまり細胞成分を流出しないよう、ある程度血漿を残すところまでにとどめる。除去が終わったらチューブを長めに残してチューブシーラーでシールして、除去した血漿の入ったバッグを切り離す。バッグ内に残った骨髓濃縮液は塊がないようほぐしておく(図 7)。



図 6 遠心後に分離スタンドにかけた骨髓液



図 7 血漿を除去した骨髓液

5) 再浮遊

遠心分離をしている間に、血漿を除去した後の骨髓濃縮液を再浮遊させるための溶液として、抗凝固剤(ACD-A 液またはヘパリン Na)入りの生理食塩液を調製しておく。

筆者の施設では生理食塩液 200mL(100mL 2 本)にヘパリン 2,000 単位を加えたものを使用しているが、本テキスト旧版で示された 500mL の生理食塩液に ACD-A 液を 50mL 添加したものでももちろん可能である。

以下筆者の施設(東京都立駒込病院)でのやり方を示す。

生理食塩液 100mL 2 本のうち 1 本にヘパリン 2,000 単位を加えておく。SCD を用いて、連結管または分離バッグのスパイクポートと、上清を除いた骨髓濃縮液のバッグのチューブを接合する。ヘパリン加生理食塩液のボトルにスパイクし、骨髓濃縮液にヘパリン加生理食塩液を加える(図 8)。次にもう 1 本の生理食塩液に同様にスパイクし、生理食塩液を加える。

これらの手順により、施設間で差がありうることに注意されたい。

バッグが複数ある場合は、SCDを用いてこの「ヘパリン加生理食塩液を加えた骨髄液バッグ」と、未添加の骨髄濃縮液のバッグのチューブを接続し、「ヘパリン加生理食塩液添加骨髄液」を未添加骨髄濃縮液の方へ移す。これを繰り返すことで、最終的に骨髄液はひとつのバッグにまとめられることになるが、最終容量が600mL以上になる場合はより大きな1,000mLバッグにまとめる(図9)。

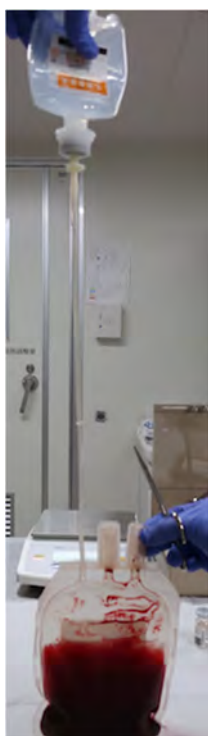


図8 ヘパリン加生理食塩液で再浮遊する



図9 最後にひとつのバッグにまとめられた骨髄液

参考文献

- 1) 中島一格、採血血液成分の分離・調製・保存、輸血用血液、日本輸血細胞治療学会誌 43:493-495、1997
- 2) 金子祐次、佐竹正博、田所憲治 ほか、複数回洗浄した洗浄赤血球製剤の品質、日本輸血細胞治療学会誌 63:757-762、2017

凍結

はじめに

2020年に流行した新型コロナウイルス感染の拡大及び防止の観点から、特に同種骨髄移植ドナーから採取した骨髄を凍結する需要が高まったことを受け、骨髄液の凍結方法をまとめたものである。前項の骨髄液の処理（プロセッシング）の赤血球除去で示したように同種骨髄移植において、レシピエントとドナーが ABO 主不適合、レシピエントが RhD 陰性でドナーの RhD が陽性の場合やレシピエントにドナーの赤血球抗原に対する不規則抗体を保有する場合など、これらの組み合わせは、ドナーの骨髄液から赤血球を除去することが必須となる。また、近年ではほとんど実施されないが、自家骨髄移植を実施する場合には、予め採取した自家の骨髄液から赤血球を除去し、単核細胞に分離し凍結する必要がある。一方、ドナーの状況や都合等で同種骨髄移植ドナーの骨髄液を凍結保存する場合は、レシピエントとドナーの ABO、RhD 血液型などの適合・不適合に関わらず、凍結前に骨髄液から赤血球除去を行うことが重要である。レシピエントとドナーの血液型が同型であっても、骨髄液中に赤血球の混入が多い状態で凍結し解凍すると、溶血等によって移植後に臨床的影響を与える。骨髄液から赤血球を除去する方法には、機器を用いる方法¹⁾²⁾と手作業を含む用手法の2つがある。本邦で代表的な血液成分分離装置には、Spectra Optia™ (TERUMO BCT 社)と COM.TEC™ (FRESENIUS KABI 社)の2機種がある。また、比重液の Ficoll 液を用いるコンパクトな自動細胞分離装置 SEPAX™ (cytiva 社)などがある²⁾。一方、用手法の分離操作は、熟練と労力を要するため基本的には推奨しない。

次に赤血球除去した骨髄液の凍結保存法であるが、従来から DMSO (Dimethylsulfoxide)を凍害保護液として終濃度 10%になるように混合し、プログラムフリーザーを用いて緩速凍結を行い、最終的に-196℃の液体窒素内で保存する方法が一般的である。しかし、5%DMSO、6%HES (Hydroxyethyl starch)、4%アルブミンを用いてプログラムフリーザーを用いない-80℃の簡易凍結法で骨髄細胞を保存し、造血の再構築が可能であると報告されている³⁾⁴⁾。また、我々も骨髄液の CD34 陽性細胞を濃縮し、同様に 5%DMSO、6%HES、4%アルブミンを用い-80℃の簡易凍結法で、コロニー形成能と表面抗原の経時的変化を検討し、骨髄再構成を報告している⁵⁾。5.4「末梢血幹細胞の凍結保存」で示したように、末梢血幹細胞の凍結法も簡便さと経費の軽減から、近年はプログラムフリーザーによる緩速凍結法にかわって簡易凍結法が広く用いられている。

骨髄分離や凍結保存は、細胞調製に熟練した作業員または熟練した作業員の指導の下に行うこと。細胞処理中に問題が発生した場合には、速やかに上長および移植担当医と連携すること。また、これらの骨髄液の処理においては「作業工程記録書」「結果報告書」に記載することが重要である。

(1) 骨髄液の凍結法フローチャート

＜赤血球除去処理＞

骨髄液中の赤血球を閉鎖回路の血液成分分離装置を用いて除去する
(CD34陽性細胞数は可能であれば参考として測定)



＜赤血球残量、細胞数測定＞

赤血球除去後の骨髄液のヘマトクリット値(Ht%)を測定し、赤血球の残量を計算する※
有核細胞数を測定する(CD34陽性細胞数は可能であれば参考程度として測定)

※日本骨髄バンクの血液型主不適合の末梢血幹細胞移植時の赤血球除去の量に準ずる(赤血球残量が多い場合には、移植担当医とも相談し、必要に応じて再度赤血球除去を試みる)。



＜凍結処理＞

赤血球除去された骨髄細胞を末梢血幹細胞の凍結方法に従い、簡易凍結法またはプログラムフリーザーで凍結し、-80℃低温冷凍庫または-196℃の液体窒素タンクで保存する。
1～2本解凍検査用サンプルも凍結し、移植までに解凍して生細胞率等を確認しておく。

(2) 血液成分分離装置を用いた赤血球除去

骨髄液を凍結する場合は、前述したように凍結操作前に赤血球除去を必ずおこなう必要がある。

無菌閉鎖回路にて赤血球、白血球および血漿に分離し、白血球成分の単核細胞層を濃縮採取をおこなう(図1)。血液成分分離装置は Spectra Optia™ と COM.TEC™ などが用いられている。

処理後は骨髄液のヘマトクリット値を測定し赤血球の残量を計算する。また、有核細胞数を測定する。CD34 陽性細胞は、可能であれば測定し参考程度とする。

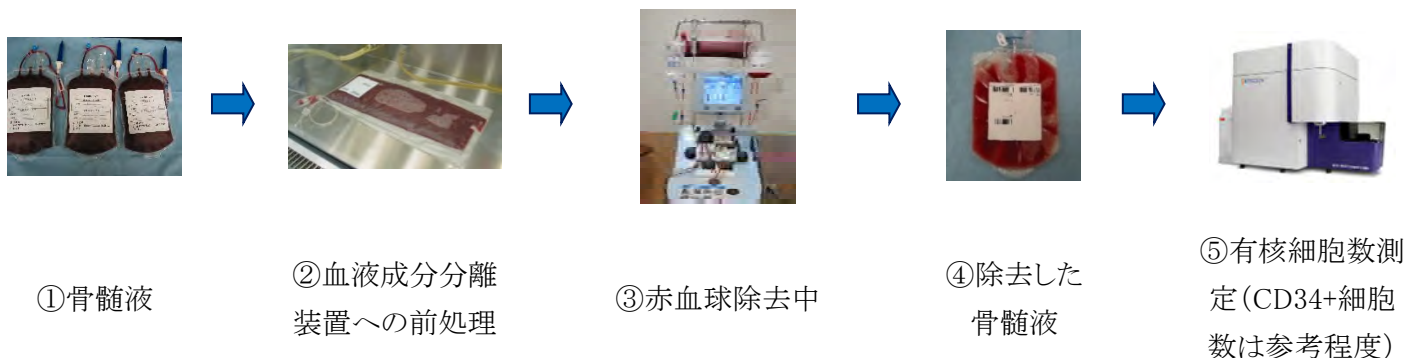


図1 自動血液成分分離装置を用いた赤血球除去(Spectra Optia™)

赤血球除去の処理方法は、骨髄液からの「赤血球除去」を参照し、自施設で使用して

いる血液成分分離装置を用いて、単核細胞層を濃縮する取扱い説明書に従い実施する。

代表的な血液成分分離装置(2機種)を用いた赤血球除去の成績を表にまとめたので下記に示す。

近年、各移植施設で多く用いられている血液成分分離装置(Spectra Optia TM)による骨髄処理後の赤血球の除去率は、平均 98.7%(97.4-99.6)を示し、赤血球残量は、平均 5.2mL(1.3-9.9)と低値を示している¹⁾(表1)。また、CD34 陽性細胞の回収率は平均 97.7%(52.9-198.3)と高値を示している(表1)。一方、比重液のFicoll液を用いるSEPA Xは 1.3 ± 0.6 (mean $\pm$ SD)と、ほとんど赤血球は除去される²⁾。

	Initial BM		Final product		Recovery(%)	
	Volume (ml)	RBCs (ml)	RBCs (ml)	RBC depletion(%)	NCs	CD34 + cells
SEPAX (n=13) ²⁾	1,083 $\pm$ 264 (650-1700)	305.7 $\pm$ 67.5 (150.2-433.5)	1.3 $\pm$ 0.6 (0.7-2.8)	99.6 $\pm$ 0.2 (99.0-99.8)	16.0 $\pm$ 15.0 [#] (8.0-28.8)	49.1 $\pm$ 22.8 (12.6-90.0)
Spectra Optia (n=28) ¹⁾	1,373 (703-1,792)	432.4 (208.8-647.1)	5.2 (1.3-9.9)	98.7 (97.4-99.6)	61.6 (29-100)	97.7 (52.9-198.3)

BM, bone marrow; RBCs, red blood cells; NCs, nucleated cells; [#]MNCs, mononuclear cells.

表1 血液成分分離装置による骨髄液の処理 ¹⁾²⁾

(3) 赤血球除去した骨髄液(骨髄細胞)の凍結

前述したが骨髄液の凍結保存には、大きく分けて二つある。①終濃度 10%DMSO でプログラムフリーザーを用いて液体窒素中で保存する緩速凍結法と②凍害保護液の終濃度 5%DMSO、6%HES、4%アルブミンとして、-80℃以下の低温冷凍庫でそのまま凍結保存するか、または一旦-80℃低温冷凍庫で凍結後、液体窒素内に移して保存する簡易凍結法がある^{3)~5)}。ここでは、本邦で汎用されている簡易凍結法を示す。骨髄液の具体的な凍結法は、赤血球除去した骨髄細胞を「末梢血幹細胞の凍結保存」で示した末梢血幹細胞の簡易凍結法に準じておこなう(図2)。

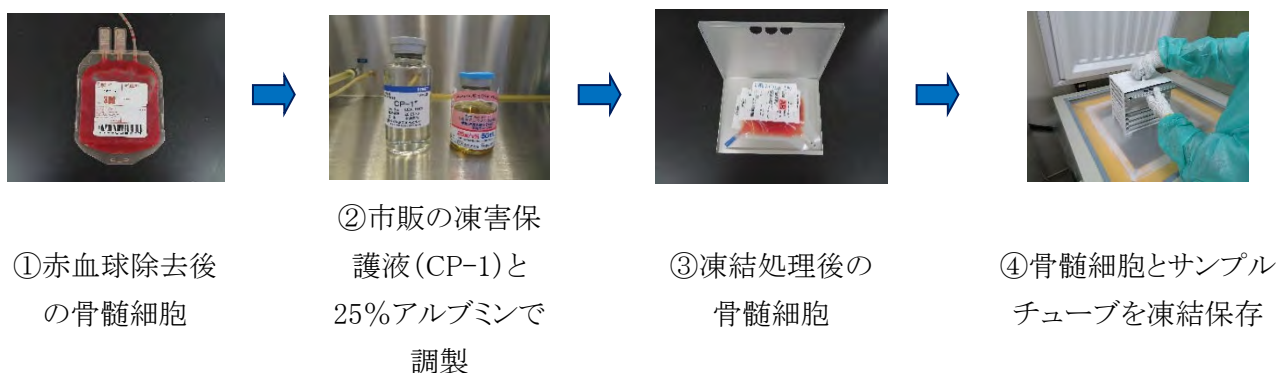


図2 赤血球除去後の骨髄細胞 簡易凍結保存

(4) 機器管理・処理工程

1) 管理

骨髄液の赤血球除去から凍結・解凍の工程は、「院内における血液細胞処理のための指針」6) に従った操作、管理が必要である。

2) 処理工程記録

細胞処理工程に対する標準作業手順書(SOP)を整備し、それに従って実施する。記録においても細胞処理工程ごとに作業者が行うべき内容を明記し、使用した試薬、凍害保護液などの Lot も記録する「作業工程記録書」を作成する。

参考文献

- 1) Méndez GA, Arroyo JL, Amunárriz C, et al. ABO-mismatched Marrow Processing for Transplantation: Comparative Results of 80 Procedures Performed With Cobe Spectra and Spectra Optia. *Transfus Apher Sci.* 2019; 58:326-331.
- 2) 岸野光司, 中木陽子, 小野崎文子, 他. 移植のために採取された骨髄液から自動細胞分離 SEPAX™ を用いた単核細胞の分離. *日本輸血細胞治療学会誌.* 2012; 58:456-462.
- 3) Stiff PJ, Murgu AJ, Zaroulis CG, et al. Unfractionated human marrow cell cryopreservation using dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch. *Cryobiology.*1983; 20:17-24.
- 4) Stiff PJ, Koester AR, Weidner MK, et al. Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch without controlled-rate freezing. *Blood.*1987; 70:974-978.
- 5) 岸野光司, 鈴木俊之, 室井一男, 他. 自家骨髄移植術における簡易凍結法下の造血幹細胞の経時的変化. *今日の移植.* 1994 ;7:381-383.
- 6) 田野崎隆二, 室井一男, 長村登紀子, 他. 院内における血液細胞処理のための指針. *日本輸血細胞治療学会誌.* 2011 ;57:184-187.

(執筆者:岸野光司、奥山美樹、査読者:吉原哲)

第5.4章 末梢血幹細胞の処理と凍結保存

はじめに

末梢血幹細胞移植において同種移植の場合には、ドナーに granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) を投与し、血液成分分離装置を用いたアフエレーシスで末梢血から幹細胞を採取する。自家末梢血幹細胞移植の場合は、2通りの方法がある。化学療法後の造血回復期に G-CSF を投与する場合と、G-CSF を単独投与する場合である。前者では、抗がん剤投与後、骨髄抑制からの回復期に G-CSF を投与し、骨髄から末梢血中に末梢血幹細胞を動員し採取する。後者は、同種末梢血幹細胞動員と同じである。動員不良例及び動員不良が予想される例において、造血幹細胞の末梢血中への動員を促進する CXCR4 ケモカイン受容体拮抗剤であるプレリキサホル(モゾビル[®]) が G-CSF と併用が可能となった。同種・自家末梢血幹細胞移植共に患者に超大量化学療法を行った後に凍結保存しておいた末梢血幹細胞を輸注し、造血機能再構築する方法である。末梢血幹細胞の保存は、細胞液に凍害防止液を混合した後にプログラムフリーザーを用いて徐々に冷却し、最終的に -196°C の液体窒素内に保管する方法が世界的に行われている。

今回は、末梢血幹細胞の濃縮調製後の凍結に凍害保護液として、dimethylsulfoxide (DMSO) と hydroxyethyl starch (HES) の混合調製した液¹⁾である CP-1 (極東製薬) を用いて、 -80°C 以下のディープフリーザー (以下 DF) で凍結する方法¹⁾⁻³⁾を中心に解説する。この方法は、比較的簡単に操作可能なため本邦では広く利用されている。

必要資材の一例

	名称	製造販売元	必要量
①	25% (または 20%) アルブミン	JB、ニチヤク、化血研	1 本
②	RPMI 1640 (液状) 11875-093	GIBCO BRL	1 本
③	細胞凍害保護液 CP-1 (100mL 用)	極東製薬工業(株)	1 本
④	ヘパリン (5mL) (ノボ・ヘパリン注 1000)	持田製薬(株)	1 本
⑤	50mL シリンジ	テルモ(株)	4 本
⑥	5mL シリンジ	テルモ(株)	1 本
⑦	三方活栓	カワスミ(株)	1 個
⑧	フローズバッグ F-100	ニプロ(株)	2 枚
⑨	サンプルチューブ	ナルジェヌンク(株)	4 本
⑩	紙製キャニスター	特注品	2 枚
⑪	CP-1 専用保冷容器	自家製造	1 コ
⑫	ペアン	一般医療器具	2 本
⑬	綿棒 (メンティップ)	日本綿棒(株)	適量
⑭	消毒用イソジン液	明治製菓(株)	適量
⑮	シャーレ (サニーシャーレ SP)	アズワン(株)	1 枚

⑯	保冷剤	市販品	適量
⑰	アルミキャニスター(AL-100:F-100 用)	ニプロ(株)	2 枚
⑱	造血細胞処理保存工程記録	自家製	1 枚
⑲	穴あき2重ハッポー箱	自家製品	1 組
⑳	オキシドシグナル培地(細菌検査培地)	関東化学(株)	1 本

使用備品の一例

①	バイオハザード対策用キャビネット(MHE-130AB3)	サンヨー(株)	1 台
②	フリーザー付き薬用保冷庫(MPR-214F)	サンヨー(株)	1 台
③	超低温フリーザー	サンヨー(株)	1 台
④	シリンジポンプ(SP-500)	JMS(株)	1 台
⑤	シェーカー(SHM-201)	旭テクノグラス(株)	1 台
⑥	チューブシーラー(AC-157)	テルモ(株)	1 台

作業手順

(1) 調製準備

- ①血液成分分離装置で末梢血幹細胞液(以下 PBSC)を採取したものを準備する。
- ②ローラーペンチで PBSC バッグライン内の PBSC 液を十分バッグ内液と混合する。
- ③ラインを約 20cm のところでシールする。
- ④ラインを切り離し、処理前サンプルとして細胞検査担当者に引き渡す。

(2) 凍害防止液の準備

- ①処理開始年月日時間、処理実施者名を造血細胞処理工程記録に記録する。
- ②CP-1 のロット番号、有効期限を記録する。
- ③25%アルブミンのロット番号、有効期限を記録する。(アルブミン製剤は、ロット管理が必要で、20 年間記録の保管が義務付けされている)
- ④CP-1 専用保冷容器に CP-1 (ボトル)を入れ、25%アルブミンを 32mL ゆっくり混和しながら加える(図 2)。



図 1 左から RPMI 1640、CP-1、25%アルブミン



図 2

⑤25%アルブミン注入量を記録する(図3)。

⑥CP-1+アルブミン＝約100 mLとなる。CP-1は、そのまま専用保冷容器で保管する。

(3)PBSC バッグにフローズバッグを接続

①フローズバッグのロット番号、有効期限を記録する。

②フローズバッグNo.1、No.2 に患者(ドナー)ID、氏名、採取(処理)年月日、製剤名、診療科名、製剤番号等を記載する(予め準備したラベルがある場合は、それを貼る)。

③フローズバッグのプラスチック針を PBSC 液バッグのポートに差し込み、フローズバッグ側ラインはペアンで止める(図4)。

④三方活栓のロット番号、有効期限を記録する。

⑤他方のラインポートに三方活栓を取り付け、50mL のシリンジを2本取り付ける。

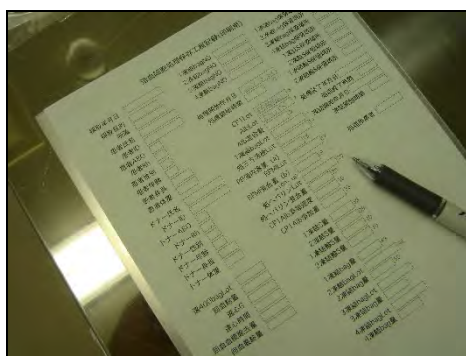


図3



図4

(4)濃縮 PBSC 液の調製

①2本の50mLシリンジでPBSC液の内容量を計量し記録する((a)とする)。(図5)

②再度PBSC液をPBSCバッグにもどす。

③RPMI1640のロット番号、有効期限を記録する。

④RPMI1640量(b)=100-(a)を計算し、RPMI1640ボトルより50mLシリンジで分取する(図6)。

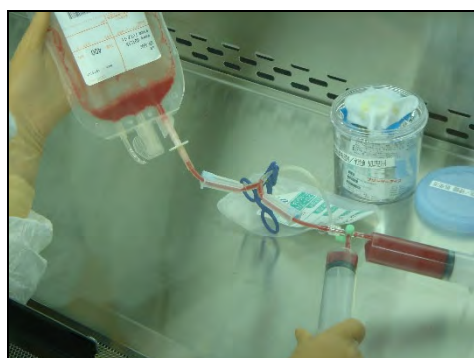


図5



図6

- ⑤RPMI1640 採取量を記録する。
- ⑥RPMI1640 50mL シリンジをフローズバッグ①の三方活栓に取り付ける。
- ⑦ヘパリンのロット番号、有効期限を記録する。
- ⑧ヘパリンを 5mL シリンジで 2mL(2000 単位)分取する(図 7)。
- ⑨ヘパリンの分取量を記録する。
- ⑩ヘパリンの 5mL シリンジをフローズバッグ①の三方活栓に取り付ける。
- ⑪二つのローラークランプを開けヘパリンを 2mL(2000 単位)注入し、次に RPMI1640(b)を注入する。RPMI1640 注入中にヘパリンシリンジを RPMI1640 で共洗いする(図 8)。PBSC 液+RPMI1640+ヘパリン=約 102mL となる。
- ⑫上記⑪濃縮 PBSC 液を冷蔵庫内に静置する(図 9)。

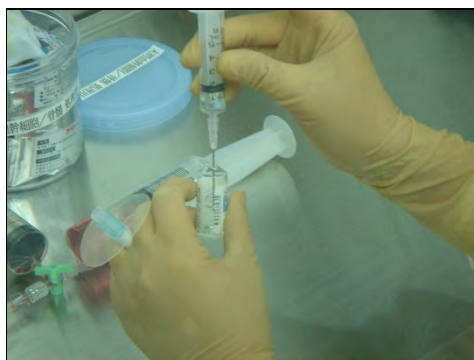


図 7



図 8

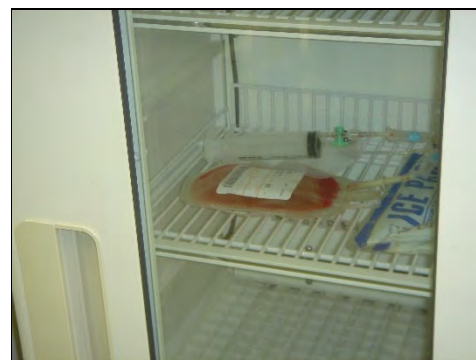


図 9

(5) 濃縮 PBSC 液にアルブミン加 CP-1 を添加

- ①アルブミン加 CP-1 を 50mL シリンジに 2 本採取し、1 本は冷蔵庫で一時保管する。
- ②アルブミン加 CP-1 入り 50mL シリンジを三方活栓に取り付けシリンジポンプにセットする。
- ③あらかじめ冷蔵庫内で冷却しておいた保冷剤で濃縮 PBSC 液バッグを包み、シェーカーに乗せて振とうする。
- ④300mL/hr のスピードで濃縮 PBSC 液バッグに注入する(図 10)。



図 10

- ⑤シリンジポンプ速度を記録する。
- ⑥アルブミン加 CP-1 を最初の 50mL 注入後、残りのアルブミン加 CP-1 50mL を続けて注入する。
- ⑦アルブミン加 CP-1 注入量を記録する。

(6) 保管用・細菌検査用サンプルの分取

- ①移植前の品質検査のための凍結保存用サンプル(滅菌チューブ)を2本準備する。
- ②凍結用サンプルチューブには、所属、日付、ID、氏名、製剤番号を記載する。(予め準備したラベルがある場合は、それを貼る)
- ③移植後の遡及調査の処理施設保管用サンプル(滅菌チューブ)1本と細菌検査用(オキソイドシグナル)培地を1本準備する。
- ④処理施設保管用サンプルチューブと細菌検査用培地には、所属、日付、ID、氏名、製剤番号と製剤「処理施設用」と記載する。(予め準備したラベルがある場合は、それを貼る)
- ⑤三方活栓に附属の 5mL シリンジで凍結用サンプルおよび処理施設保管用サンプルを 2mL 分取する。
- ⑥凍結保管用サンプル各 0.5mL を 2 本のサンプルチューブに分取し、量を記録する(図 11)。
- ⑦処理施設保管用サンプル各 0.5mL を 1 本のサンプルチューブに分取し、量を記録する。



図 11

(7) CP-1 混合 PBSC 液をフローズバッグへ充填

- ①三方活栓に接続している 50mL シリンジを利用し、アルブミン加 CP-1 を添加した濃縮 PBSC バッグから CP-I 混合 PBSC 液を採取し、接続しているフローズバッグNo.1 に 100mL 移す(図 12)。最後にエアを抜き、チューブシーラーで 3 点シールを行い切り離す(図 13)。
- ②フローズバッグNo.1 のラベルに内容量を記載する。
- ③処理工程記録に内容量を記録する。

- ④直ちに保冷剤で包む。
- ⑤アルブミン加 CP-1 を添加した濃縮 PBSC 液バッグの他方ポートにフローズバッグ No.2 を接続する(図 14)。



図 12



図 13



図 14

- ⑥フローズバッグNo.2 に所属、日付、ID、氏名、製剤番号を記録する(予め準備したラベルがある場合は、それを貼る)。
- ⑦インジェクションポートに 50mL シリンジを接続する。
- ⑧接続 50mL シリンジで残りの CP-I 混合 PBSC 液を計量してフローズバッグNo.2 に注入し、最後にエアを抜き 3 点シールする。
- ⑨フローズバッグNo.2 に内容量を記載する。
- ⑩内容量を処理工程記録に記録する。
- ⑪フローズバッグNo.1.No.2 とサンプルチューブ 4 本を保冷剤で包み、搬送用の容器に収納して細胞調製室の外へ搬出する(図 15、16)。
- ⑫調製作業終了年月日時間を処理工程記録に記録する。



図 15

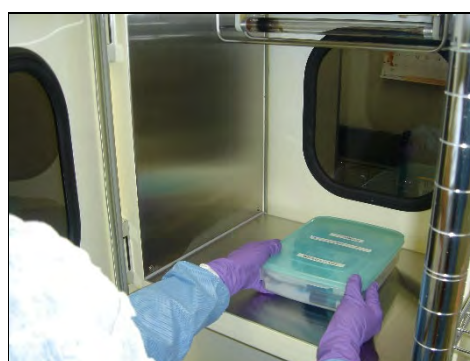


図 16

(8) 凍結作業

- ① フローズバッグNo.1.No.2 をそれぞれビニールの袋に入れる。
- ② アルミキャニスター（ニプロ）に収納し、蓋をテープにて固定する(図 17)。
- ③ -85°C の DF 内の発砲スチロール板に静置する(図 18)。
- ④ 凍結および処理施設用サンプルチューブは穴あき2重発砲スチロール箱に収納し、フタをテープで固定する(図 19)。
- ⑤ -85°C の DF に直接静置する(図 20)。



図 17



図 18



図 19



図 20

- ⑥ 保管用紙製キャニスターに所属、日付、ID、氏名、製剤番号および内容量を記載する。
- ⑦ 処理工程記録に凍結開始年月日時間を記録する。
- ⑧ フローズバッグと処理施設用サンプルチューブは、3 時間以上または一昼夜 -85°C の DF 内に静置する。
- ⑨ 凍結が終了したら、 -85°C の DF 内でフローズバッグNo.1.No.2 を金属製キャニスター（ニプロ）より取り出し、ていねいに保管用紙製キャニスターに移し替える。
- ⑩ 凍結保存用サンプルは、 -85°C の DF 内で穴あき2重ハッポースチロール箱から取

り出しフローズバッグNo.1.No.2 の入っている保管用紙製キャニスターに収納する。

⑪保管用紙製キャニスター（フローズバッグ・サンプルチューブ含む）は、保管番号付きラックの所定の場所に収納する。

⑫「末梢血幹細胞保管管理台帳」に製造年月日、製剤番号、製剤名、ドナーID、ドナー名等の必要事項を記録する。

凍結による細胞傷害性

細胞を凍結することは細胞治療において細胞の機能を維持し、長期保存するために広く普及している。凍結速度や凍害保護物質の添加を守り凍結しなければ、解凍後に細胞機能を維持することは難しい。急速冷凍を行うと細胞内氷晶が形成され、細胞内器官に傷害を与え細胞壁を破棄してしまう（細胞内凍結）と緩慢冷凍では細胞内で氷晶が形成される前に細胞外の水が凍結する（細胞外凍結）がある。細胞外の水が凍結することにより細胞膜内側と外側に浸透圧の差が生じ、細胞内の水が細胞外へと移動し細胞が委縮してしまう。細胞内の溶質濃度の上昇は細胞が生存し機能を維持するのに影響があり、細胞を傷害させる要因には氷晶の形成と溶質濃度が大きくかかわっている。最適な冷却速度にそれぞれの影響を最小限にする必要があり、一般には $1\sim 3^{\circ}\text{C}(1^{\circ}\text{C})/\text{min}$ の冷却速度が多く用いられている。これらの細胞傷害要因を少なくし細胞を守るため凍結保護物質が用いられる⁴⁾。

世界的に用いられているプログラムフリーザーは、液体窒素を使用して液体窒素の噴出量と加温により凍結速度を制御し設定到達温度まで凍結できるようにプログラムされている。プログラムフリーザーを使用するにあたり、一定の品質を確保するためにも操作手順の作成や凍結記録の保管は勿論、正しい温度が測定されているか、機器の不具合がないかをメーカー一点検や自主点検を定期的の実施することが品質を担保することとなる。

定期的な凍結速度と品質の確認

(1) 凍結速度の調節

-85°C のDFを使用する簡易凍結法は、一律な環境であるため凍結速度は凍結容器形状・材質・大きさ等に大きく左右される。一般的なプログラムフリーザーを用いた方法と類似した凍結速度($1\sim 3^{\circ}\text{C}/\text{分}$)に調節する必要がある⁵⁾。フローズバッグとサンプルチューブ内の末梢血幹細胞は、凍結保存容器と量の違いから -85°C DFに静置した場合、同一の速度で凍結は進まない。フローズバッグは遅く、サンプルチューブは早い傾向となる。このような場合、フローズバッグを金属製キャニスターに収納して冷却速度を早くする。また、DFの底に発泡スチロール板を敷き、その上にフローズバッグ入りアルミニウム製キャニスターを静置すると、さらに凍結速度を細かくコントロールすることが出来る。サンプルチューブは断熱材等で包装して冷却速度を遅くし、双方の凍結速度を調節して同じ速度で凍結出来るように工夫する(図21)。

(2) 解凍後の品質検査による適切な凍結速度の決定

次に、前述の条件で凍結した場合、解凍後の品質が適切かどうかを予め検証する。検査は、一般的に凍結前・解凍後の「有核細胞数」、「細胞生存率」、および「CD34 陽性細胞数」があり、可能であれば「CFU-GM(コロニーアッセイ)」も検討すると良い。これらのデータの記録も保管すること。このような検査結果から末梢血幹細胞が良い品質で凍結される凍結速度を決定することを推奨する。

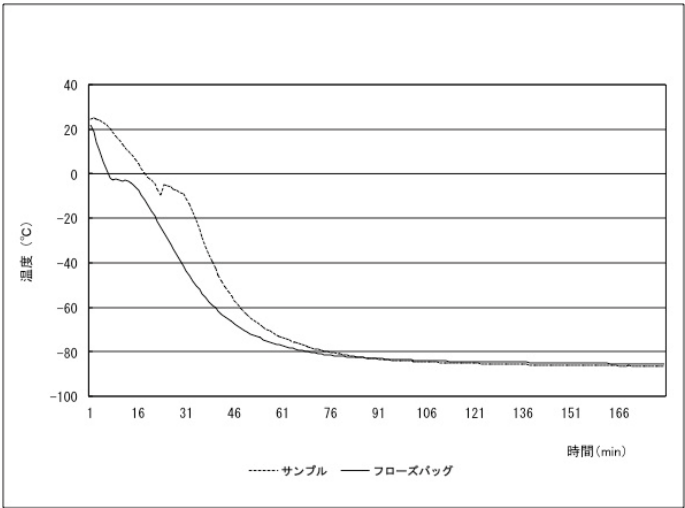


図 21 -85℃の DF を用いた凍結バッグとサンプルチューブの凍結曲線の一例

(3) 定期的な凍結速度と品質の確認

適切な凍結速度(解凍後の品質も良好)が決定され末梢血幹細胞の凍結業務を行う際、凍結速度が恒常的であるかを定期的に検証する必要がある。方法としては、ダミー(前述の「CP-I 混合 PB 液」から細胞成分を除いたもの)をフローズバッグおよびサンプルチューブに充填し温度センサーを取り付けて凍結作業を行い適切な凍結曲線が描けるか確認(あらかじめ検討した条件の凍結曲線と比較)する。記録も保管する。

毎回同じような凍結曲線が描ければ、末梢血幹細胞は良い品質で凍結され保管されることとなる。また、解凍後の品質も良好と言えよう。一連の凍結について描いた凍結曲線は、末梢血幹細胞の保存に関しての「品質保証書」となる。

このように-85℃の DF を用いた簡易的な凍結方法でも比較的良好な成績が得られている。(表 1)

項目	凍結前	解凍後	回収率(%)
保存期間(日)	-	74	-
生細胞率(%)	98.30	93.20	-
有核細胞数(x10 ¹⁰)	1.40	1.16	85.40
CD34 陽性細胞数(x10 ⁶)	112.00	99.26	88.63
CFU-GM(x10 ⁶)	21.88	19.12	85.59

表 1 凍結前・解凍後の回収率の一例(n=47)

おわりに

CP-1とDFを用いた簡易凍結方法は、末梢血幹細胞処理のような日常業務では比較的簡単に操作可能なため普及した。凍結保存期間は、移植時期が比較的近い場合は良いが、長期にわたる場合は液体窒素内での保存が品質的にも安定する。

院内製剤は、手順書を作成し、清潔な環境下で製造し、品質検査を行い、記録を保管することが業務の質の向上、担保に繋がるものと考えている。

参考文献

- 1) 岸野光司,小幡隆,菅野直子,他. アフェレーシス幹細胞の簡易凍結保存法における造血幹細胞機能の保持に関する検討. 日本輸血学会雑誌. 1992;38:337.
- 2) 岸野光司,室井一男.VII細胞治療とそのソース.末梢血幹細胞.細胞治療認定管理師制度指定カリキュラム第2版.中外医学社.東京.2021;133-137.
- 3) Makino S, Harada M, Akashi K, et al. A simplified method for cryopreservation of peripheral blood stem cells at -80°C without rate-controlled freezing. Bone Marrow Transplant.1991;8:239-244.
- 4) 品川克至,原田実根.造血幹細胞凍結保存法の現状.低温医学 1996;22:169-175.
- 5) Clark J, Pati A, McCarthy D. Successful cryopreservation of human bone marrow does not require a controlled-rate freezer. Bone Marrow Transplant.1991;7:121-125.

（執筆者：五十嵐靖浩、岸野光司、査読者：奥山美樹）

第5.5章 骨髄・幹細胞・その他製剤の解凍

はじめに

細胞療法に用いられる製品の多くは、凍結状態で保管される。投与時に先だって行われる「解凍」の作業を、いかに管理された状態で行うかが重要である。解凍後の細胞生存率や質は、解凍作業により大きく左右される。

解凍時には、自然解凍あるいは加熱による解凍を問わず、細胞「外」の水分が細胞「内」の水分より先に解け始めるため、細胞外の浸透圧が低下する。そのため、細胞外の水分が細胞内へと流入し、細胞は膨張し傷害を受ける。また、解凍点付近で固相から液相に移る際に時間がかかると、解凍⇔凍結の平衡状態が生じ、再氷晶形成が起こり、細胞傷害がおこる。

これらの傷害を回避するには 37～40℃程度に保った恒温槽で「急速に解凍する」ことが必要である。さらに、細胞保存液中にジメチルスルホキシド(DMSO)や HES などの凍害防止剤が含まれていると、細胞外浸透圧低下に伴う細胞内への水分流入が抑制できる。その結果、細胞膨張による傷害や細胞凝集による回収率の低下が抑えられる。DMSO や HES の体内への投与による副作用は軽微であることに加えて、解凍後の細胞が短時間 DMSO などに暴露されても細胞傷害は無視できる範囲であるため、一般的に解凍後の洗浄操作は不要である¹⁾。逆に、洗浄などを行うと、浸透圧性の細胞傷害や、死細胞から析出した粘着性に富む DNA やフィブリンが細胞凝集塊を形成するため、無視できない量の細胞損失が生じることが多い。

また、解凍時に凍結バッグ(一次容器)の破損が見つかることがあるので、滅菌処理された外装バックの中にいれて解凍することが望ましい。なお、一般的に DMSO は室温で細胞毒性があることが知られているので、解凍後はなるべく早く患者に投与する。そのため、解凍作業を病棟やベッドサイドで行うことも有効である。必要に応じて、解凍後の品質検査(解凍後のサンプルを用いて生細胞率など)の検査を行う。

これらの背景をもとに、対象となる細胞種・製品に応じて解凍手順や運用を個別に設定する必要がある。解凍は比較的シンプルな作業ではあるが、標準作業手順書や工程記録を事前に定めて実施することが重要であり、その重要性は、FACT-JACIE 指針でも謳われている(D5.1.7 凍結保存と解凍)。

骨髄・末梢血幹細胞・リンパ球の解凍

歴史的に最も古くから、そして件数も多くなされてきたのが、造血幹細胞移植あるいはドナーリンパ球輸注に関する解凍作業であろう。そこでまず、骨髄・末梢血幹細胞移植あるいはドナーリンパ球輸注の際に行われる解凍作業について、具体的な手順を概説し、留意点を列挙する。

【解凍手順の概要】

- 1.恒温槽を洗浄後、安定した台の上に置き、水道水で満たし、37～40℃に設定する。
必要な物品は事前に用意しておく。
- 2.解凍前に、細胞を輸注する患者担当医や病棟看護師と、輸注する患者氏名、患者ID、輸注するバッグ（最終日と個数など）、輸注開始時刻などを、所定の用紙と照合・確認する。この際、各施設の細胞払い出しの適合基準に合っていることを確認すること。
- 3.保冷库（液体窒素、超低温保冷库など）からバッグを確認して1つずつ取り出し、ラベルを確認する。バーコードリーダーを用いた管理システムがある場合は、解凍前に照合確認をすることが望ましい。
- 4.解凍時に起こりうる有害事象（表1）を再度確認した上で、凍結保存バッグを容器（アルミキャニスター、紙容器など）から注意深く取り出し、清潔なバッグに入れて、37～40℃の恒温槽で、完全にお湯につけて手でもみながら、1回1バッグずつ固形物がなくなるまで急速に解凍する。
- 5.解凍後はなるべく早く患者に輸注する。
- 6.臍帯血など特に容量が少ない場合は、容器内を清潔な生理食塩液で1～2回リンスして、その液も輸注する。
- 7.解凍後に輸注ラインあるいは保存容器から検体の一部を清潔操作で採取し、検査用に提出することが望ましい。

【解凍手順の留意点】

- 1.解凍には、ヒーター機能を備えた「恒温槽」を用いる。加熱機能の無い水槽内にためたお湯ではすぐに湯温が下がってしまうので不適切である。また、ヒーターに内蔵された温度計の校正を定期的に行う必要がある。校正が行われていない場合は大きな誤差が生じることがあり、別の温度計を用いて温度をモニタリングすることが望ましい。
- 2.解凍時に凍結バッグの破損（亀裂やピンホールからの液漏れ、バッグの膨張や破裂）が見つかることがあるので、滅菌処理された外装バックの中にいれて液漏れなどがないかを注意深く観察しながら解凍することが望ましい。液漏れを見つけたら、すぐにそれ以上漏れて細胞損失をしないようにシーラーで穴をふさぐか、別のバッグに清潔に内容物を移すなどを行う。その時の状況は逸脱として記録に記載する。破損されたバッグ内の細胞を患者に投与するかは、事前に逸脱手順として定めておいた上で、最終的には、品質管理責任者と臨床側の担当医が相談して決定する。
- 3.処理・凍結・解凍などの途中に細胞が細菌や真菌で汚染される可能性があることが報告されている。保冷库やバッグの外側は無菌ではないことに注意する。

- 4.輸注の際に患者に有害事象が発生して、次バッグ以降の輸注時刻がずれることがあるので、1回1バッグずつ、進行状況を確認してから解凍を開始する。
- 5.凍結保護剤である DMSO は室温では造血幹細胞に毒性があると考えられてきたが、1時間以内の曝露であれば問題はない^{1),2)}。しかし、解凍時にあまり温めすぎないように注意し、解凍後はなるべく早く患者に投与する。
- 6.DMSO の生体毒性（アレルギー反応、低血圧、発疹、呼吸困難、腹痛、嘔気、下痢など）、凍結細胞中に混入した赤血球による腎機能障害、細胞小凝集塊による低酸素血症、容量負荷に伴う高血圧や頭痛、不整脈など、輸注に関する合併症も知られている。これについては、本テキストの別項目を参照されたい。

解凍（前）後の品質評価

解凍前の品質評価は、保存環境の確認と、製品の外観チェックが主になる。

保存環境に関しては、液体窒素ないし冷凍庫において、その製品の保管中に大幅な温度逸脱がなかったかを改めてレビューする。通常は、逸脱が発生したそのタイミングに、保管されている製品に関する評価が行われているが、解凍前にも最終的に確認しておくことが望ましい。

外観に関しては、大きなひび割れや破損がないかを確認する。ただし、細かいひび割れなどのバッグ破損は、解凍して初めてわかることが多いため、ここでのチェックはスクリーニングの一つである。

一方、解凍後の品質評価は、製品の外観チェックと、製品そのものの検査が主である。

外観チェックは投与前と同様、バッグの破損がないか、そして解凍が問題なく行われているか（凝固や凝血塊）、また、製品の色調が想定された範囲内にあるか、異物が混入していないか目視で確認する。

製品そのものの検査は、細胞数や生細胞割合の確認を行うことが多い。ただ、これは製品や状況により必要時に行う検査であって任意であることと、解凍後は速やかに投与することが多いため、検査結果が後追い報告になることを理解しておく必要がある。

テムセル®の解凍

同種移植後の急性移植片対宿主病に対して用いられる間葉系幹細胞であるテムセル®は、原料となる健常成人骨髄血を加工した上で、凍結して納品される。再生医療等製品として取り扱いが厳密に定められており、製造元の Web サイトから閲覧可能である。

体重から算出される投与量をあらかじめ把握した上で、希釈用の生理食塩液をシリンジ内に用意し、恒温槽内で解凍したテムセルを速やかに希釈する必要がある。製造元提供のマニュアルを元に、各施設の実情に合った形で標準手順書および記録書を作成し、実際の作業を行う人員と、指図と記録を行う人員の二人体制で行うことが望ましい。

CAR-T 製品の解凍

CAR-T 細胞製品の解凍・投与方法については、各製品の「適正使用ガイドライン」にその詳細が記載されている。このガイドラインは、各メーカーがインターネット上で掲載し、簡単に閲覧可能であるため、投与前に必ず詳細を確認されたい。一定の頻度で改訂されるため、改訂の連絡があれば、施設内の手順書に反映する必要がある。

各製品で開発段階の SOP に準拠しており微妙な違いがある。主な着目点として、製品の管理環境（液体窒素タンクを要するか、超低温冷凍庫でよいか？）、解凍場所とそこまでの移動方法（病棟での施行が可能か？）、解凍方法（恒温槽あるいは室温か？）、解凍後の投与時間や投与期限、投与速度、投与後バック内の生理食塩液を用いたリンスの有無、などである。

各施設においては、このような違いに注意して、施設ごとに保管・解凍・投与の SOP や記録書を作成し、逸脱のないよう十分注意を払う。解凍中にトラブルが発生した場合には、ただちに製薬会社のホットラインに相談して、対策の指示を仰ぐのがよい。また、解凍や投与に関する時刻も詳細に記録を残しておくことが重要である。

参考文献

- 1) Rowley SD, et al. Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells. Bone Marrow Transplant. 1993;11:389-93.
- 2) Branch DR, et al. Hematopoietic progenitor cells are resistant to dimethyl sulfoxide toxicity. Transfusion. 1994;34:887-90.

（執筆者：奥山美樹、新井康之、査読者：岸野光司）

第5.6章 幹細胞輸注および合併症

幹細胞輸注前の準備

幹細胞輸注に際しては、患者に心電図モニター、パルスオキシメーターを装着して、救急対応できる状況を整える。輸注の際に用いる静脈ルートと、輸血セットを確認する。一般的に流通している輸血セットには白血球除去フィルターは搭載されていないが、幹細胞輸注時には白血球除去フィルターは決して使用しないようにする。また幹細胞バッグと輸注する患者が一致しているかの照合確認を確実に実施する。

輸注前投薬には、ステロイド（例、ヒドロコルチゾン[ソル・コーテフ®]100～200 mg）、抗ヒスタミン薬（例、ヒドロキシジン塩酸塩[アタラックス P®]25 mg）を使用する。ABO 血液型主不適合移植の際には、ハプトグロビン 4000 単位投与を行っても良いが、輸注される赤血球量は少なく、溶血の程度は許容できるとして、ハプトグロビン投与を必須としては行わない施設も多い。

非凍結骨髄液の輸注

ABO 血液型同型もしくは副不適合の場合には、交差適合主試験陰性を確認する（陽性の場合には、赤血球除去処理を行ってから輸注する）。ABO 血液型同型で交差適合主試験陰性であれば、処理を行わず骨髄バッグに、輸血セットを接続して、緩徐に点滴静注投与を開始する。アレルギー反応や SpO₂ 低下が出現しないかどうかを注意深く確認しながら、徐々に投与速度を上昇させる（例：50mL/h で開始して、最大 150～200mL/h 程度で投与）。骨髄液の総量は 1000mL 前後に達するため、輸注には 5 時間以上要することも少なくない。後述のように骨髄輸注中には血圧上昇が高頻度に認められる。また、過去の化学療法や前処置の影響で患者に心機能低下を伴うこともあり、骨髄液による循環系への容量負荷によって心不全が誘発されることがある。定期的に血圧や SpO₂ を確認して、必要に応じて利尿薬を投与する。また骨髄液には採取時に添加されたヘパリンが 10 単位/mL の濃度で含まれるので、1000mL の骨髄液ではヘパリン 10000 単位が含有される計算で、特に輸注速度が速い場合には出血傾向の出現に注意が必要である。そのため未処理骨髄液を投与する場合にはプロタミンによるヘパリンの中和を検討する。

ABO 血液型主不適合がある場合には、患者が有する抗 A 抗体や抗 B 抗体が骨髄バッグに含まれるドナー赤血球と反応して溶血を起こすので、輸注前に骨髄血の赤血球除去処理を行う（詳細は 5.3 章を参照）。また ABO 血液型主不適合に該当しなくても患者が不規則抗体を有し、その不規則抗体にドナー赤血球が反応する場合には、同様に骨髄血から赤血球除去を行う必要がある。一方で、ABO 血液型副不適合では骨髄バッグ中のドナー血漿成分に含まれる抗 A 抗体や抗 B 抗体が患者赤血球を溶血させるため、骨髄血から血漿除去を行う。

非凍結末梢血幹細胞の輸注

通常、末梢血幹細胞バッグへの赤血球混入は少ないが、輸注赤血球量が 20mL 以上となる場合にはハプトグロビンの前投薬や赤血球除去を検討する。緩徐に投与を開始して、アレルギー反応や SpO₂ 低下が出現しないかどうか注意深く観察を行う。副反応出現がなければ徐々に速度を上げて投与を行う(例:50mL/h で開始して、最大 150~200mL/h で投与)。輸注終了後は、生理食塩水で点滴ルートを洗い、ルート内に残った細胞をできるだけ投与する。輸注が 2 日間に及ぶ場合には、GVHD 予防の MTX 投与は幹細胞輸注日と重ならないように投与日を移動する。

凍結末梢血幹細胞あるいは凍結骨髄の輸注

前投薬など幹細胞輸注前の準備が整ってから、輸注する凍結幹細胞バッグを確実に照合確認の上で解凍作業を行う(詳細は 5.4 章を参照)。幹細胞解凍後は、凍害防止目的に hydroxyethyl starch (HES) やアルブミンとともに添加されている dimethyl sulfoxide (DMSO) による細胞傷害を最小限にするため、速やかに輸注を開始するべく、バッグを輸血セットに接続して点滴静注投与を行う。最初は緩徐に投与を行い、アレルギー反応や SpO₂ 低下が出現しないかどうか注意深く観察を行う。副反応がなければ徐々に速度を上げて投与を行う。輸注終了後は、生理食塩水で点滴ルートを洗浄してルート内に残存する幹細胞をできるだけ投与する。

臍帯血の輸注

前投薬など幹細胞輸注前の準備が整ってから、輸注する臍帯血バッグを確実に照合確認の上で解凍作業を開始する(詳細は 5.5 章を参照)。解凍した臍帯血バッグに添付のコネクタを慎重に装着してから、ロック付きシリンジを用いて臍帯血を出来るだけ多く抜き取る(大小 2 つの内腔を併せて約 25mL; 図1)。次に 1mL シリンジでキメリズム用、生細胞数カウント用に検体を採取する(例:合計 0.2mL)。続けて、別のシリンジで生理食塩水 20mL 程度を吸い、空になった臍帯血パック内を洗い、内腔に残存した細胞を回収する。ベッドサイドで直ちにシリンジに回収した臍帯血を 10mL/分程度の速度で約 2 分間かけて緩徐に静脈注射して投与する。また臍帯血パック内を洗浄したシリンジも同様に緩徐に静注する。輸注時には静脈ルートのできるだけ患者の体に近い位置から輸注し、輸注終了後に生理食塩水を点滴するなどしてライン内に細胞が残らないようにする。

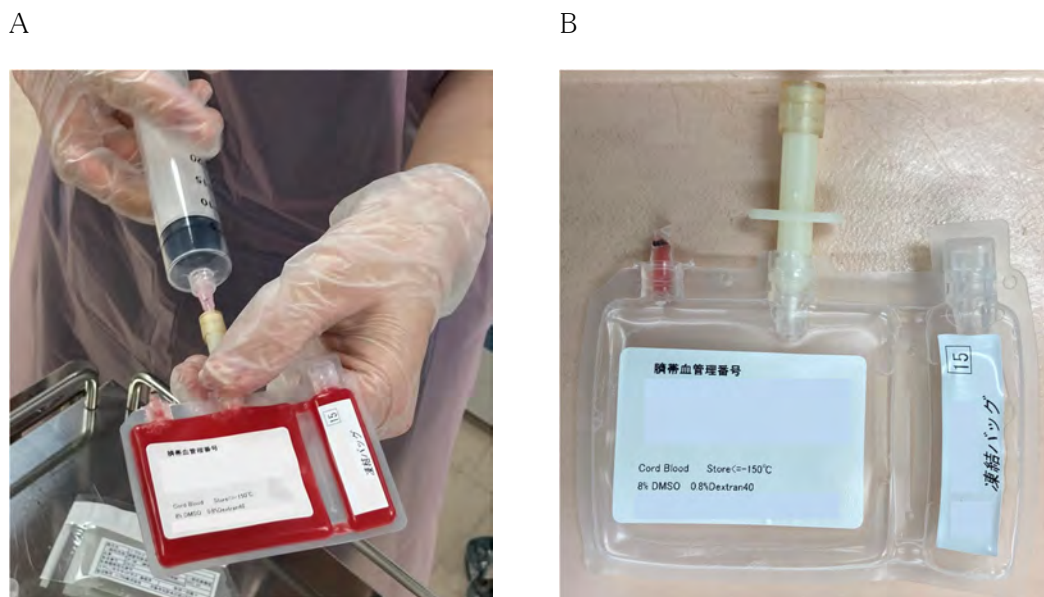


図1 臍帯血回収の操作

(A) 解凍済みの臍帯血バッグからコネクタを介してシリンジで臍帯血を回収する

(B) 臍帯血回収および内腔洗浄後の臍帯血バッグ

輸注関連有害事象

造血幹細胞輸注の際に生じ得る輸注関連有害事象には、顔面紅潮や血圧上昇など軽症のものから、アナフィラキシーなど極めて重篤なものまで多岐にわたる¹⁾。輸注関連事象の正確な頻度やリスク要因について、日本輸血・細胞治療学会が中心となって大規模な前方視的な調査を行い、その結果が報告された²⁾。同種移植 835 例(末梢血幹細胞 280 例、骨髄 332 例、臍帯血 223 例)、自家移植 290 例について解析され、全体として約半数の症例で何らかの有害事象が報告された。Grade2 以上の有害事象については幹細胞ソースによって違いがあり、非凍結同種骨髄で 37.7%と最も頻度が多く、同種/自家末梢血幹細胞で 20.9%、同種臍帯血で 19.3%と報告されている(表1)。Grade 3 以上の有害事象は 117 例でみとめられ、うち 3 例では生命に関わる有害事象(臍帯血移植におけるアナフィラキシー1例、凍結同種末梢血幹細胞における低酸素および腎障害が 2 例)が報告された。

末梢血幹細胞や同種臍帯血においては、幹細胞凍結保存の際に細胞凍害保護目的に使用される DMSO に起因する輸注関連有害事象が少なくない。実際、本邦での研究において、凍結保存を経た末梢血幹細胞では、凍結保存を経ない(DMSO 使用のない)末梢血幹細胞よりも有害事象が有意に多く、また投与された DMSO 用量が多いと Grade2 以上の有害事象の頻度が増えることが報告された。

DMSO による異臭(ニンニクや青のりの臭いと例えられることが多い)の訴えをしばしば経験するほか、DMSO が誘発するヒスタミン放出による反応がみられる。その多くは、輸注時の慎重な観察と投与速度を遅くするなどの対応によって対処可能であるが、DMSO はときに

	同種末梢血幹細胞 (n = 280)	同種骨髄 (n = 332)	同種臍帯血 (n = 223)	p value
悪心・嘔吐	12.3%	7.9%	3.7%	0.002
異臭	10.8%	0.6%	13.1%	<0.001
紅潮	4.7%	5.4%	0.9%	0.010
体温上昇	5.1%	1.6%	0.9%	0.008
アレルギー反応	6.6%	3.9%	1.8%	0.019
低酸素血症	6.6%	3.4%	2.8%	0.863
高血圧	19.9%	39.9%	17.9%	<0.001
不整脈	0.4%	1.8%	1.8%	0.192
徐脈	1.8%	3.4%	4.5%	0.223
ヘモグロビン尿	3.9%	1.8%	0.9%	0.079
腎不全	1.0%	1.2%	0.9%	0.999
肝不全	2.9%	2.4%	0.4%	0.101

表1 同種移植時にみられる輸注関連有害事象

本邦で実施された幹細胞輸注時の有害事象の前方視的観察研究²⁾から

アナフィラキシーや不整脈を誘発することも知られており、DMSO を洗浄してから幹細胞を輸注する試みもなされている³⁾。現在、細胞凍害保護目的にひろく国内で使用されている CP-1[®] (極東製薬工業株式会社) は、保存時の終濃度で DMSO 5%、HES 6% になるように使用されるので、従来の 10% DMSO を用いた保存よりも輸注時の DMSO 投与量は少なくなる計算である。近年、国内での行われた CP-1[®] の安全性について評価された研究では、末梢血幹細胞について CP-1[®] を用いた保存と DMSO 単独を用いた保存を比較して、輸注関連有害事象の頻度は同等と報告されている⁴⁾。同報告では、輸注時に体内に投与される CP-1[®] の総投与量の安全性についても評価されており、解析されたコホートにおいては CP-1[®] 投与量には幅があるものの 13~14mL/kg 投与された症例においても重篤な有害事象は認められなかったことから、幹細胞の保存バッグ数が多い場合などに、輸注時の CP-1[®] 投与量が多くなること自体は通常は問題にならないと考えられる。しかし DMSO 輸注用量が多いことが有害事象の頻度増加と相関するとの報告や、DMSO が輸注後 48 時間体内に残存するという薬物動態の知見もあるので、CP-1[®] 輸注量が多く見込まれる際には洗浄を行うことも選択肢になる⁴⁾。

また DMSO に起因しない有害事象も重要である。新型コロナウイルス感染症流行以前には同種骨髄のほとんどは凍結を経ずに輸注されてきたが、この同種骨髄は他の幹細胞ソース (DMSO を使用していることが多い) と比較して、Grade2 以上の輸注関連有害事象の頻度が多いことが本邦から報告されている。特に同種骨髄では、輸注後の高血圧が多くみられ

る。赤血球除去を行った骨髄では、行わなかった骨髄より高血圧の頻度が下がった(1.4% vs. 5.1%)と報告されており、血圧上昇には骨髄バッグ中に含まれる赤血球の関与が示唆される。また骨髄バッグに含まれる血漿成分に対するアレルギー反応も無視できないと考えられ、ABO 血液型副不適合で血漿を除去した場合には除去しない幹細胞輸注と比べてアレルギー反応の頻度が少ない(1.3% vs. 5.6%)と報告されている²⁾。

輸注関連有害事象の頻度上昇に関わる因子として、女性レシピエント、リンパ系腫瘍(骨髄系腫瘍と比較して)、輸血の副反応の既往があること、骨髄移植(臍帯血移植と比較して)、輸注容量が10mL/kg以上であることが抽出された²⁾。

本邦の臍帯血輸注の有害事象に焦点を当てた報告⁵⁾では、6512例について担当医からの有害事象報告に基づいて検討が行われた。128例(2.0%)に輸注時の有害事象を認め、内訳は高血圧が35件と最も多く、続いてアナフィラキシーを含むアレルギー反応が多く認められた。Grade 4以上の重篤な有害事象は19例(0.2%)に出現し、内訳はGrade 4についてはアナフィラキシー14例、敗血症と血圧低下が各1例、Grade5(死亡)の3例については、アナフィラキシー、心不全、敗血症が各1例であった。敗血症例については臍帯血の加工中に保存されたサンプルの培養検査で起炎菌は検出されなかった。先の前向き試験の結果と合わせても、臍帯血は他の移植ソースと比べて、全体として有害事象頻度は低い傾向はあるものの、重篤な副作用が生じ得ることが確認された。

以上から、輸注に際しては、輸注関連有害事象についてリスク因子の有無と幹細胞ソース毎の有害事象の特徴に留意して、予め安全な輸注を計画するとともに、輸注時には患者の症状やバイタルの変化を綿密に観察することが重要である。

参考文献

- 1) Alessandrino P, Bernasconi P, Caldera D, et al. Adverse events occurring during bone marrow or peripheral blood progenitor cell infusion: analysis of 126 cases. Bone Marrow Transplant. 1999;23(6):533-537.
- 2) Ikeda K, Ohto H, Okuyama Y, et al. Adverse Events Associated With Infusion of Hematopoietic Stem Cell Products: A Prospective and Multicenter Surveillance Study. Transfus Med Rev. 2018.
- 3) Shu Z, Heimfeld S, Gao D. Hematopoietic SCT with cryopreserved grafts: adverse reactions after transplantation and cryoprotectant removal before infusion. Bone Marrow Transplant. 2014;49(4):469-476.
- 4) Ikeda K, Minakawa K, Yamahara K, et al. Comparison of cryoprotectants in hematopoietic cell infusion-related adverse events. Transfusion. 2022;62(6):1280-1288.
- 5) Hashimoto S, Kato K, Kai S, et al. Adverse events caused by cord blood infusion in Japan during a 5-year period. Vox Sang. 2023;118(1):84-92.

(執筆: 城友泰、池田和彦、査読: 高梨美乃子)

第6章 システムによる血液細胞製剤の管理

はじめに

近年増加している各種細胞製剤、再生医療等製品の管理は、多くの施設において輸血部門が担っている。これらの製剤は、通常の血液製剤と同様に輸血管理システムで管理し、電子カルテで電子認証を行うことが可能であるが、その対象は、保険診療としての再生医療等製品の他、再生医療等安全性確保法下の臨床研究や自由診療の細胞加工物、遺伝子治療分野の製品まで多岐にわたるため、多様な製剤の特性に合わせて安全かつ適切に管理する工夫が必要である。

一口に細胞製剤・再生医療等製品といっても、血縁者間移植や自家移植に用いる造血幹細胞は院内採血による製剤であり、骨髄バンクや臍帯血バンクからの造血幹細胞は院外製剤に当たる。ドナーリンパ球輸注(DLI)で用いるリンパ球は、院内採血製剤・院外製剤の双方があり得る。CAR-T細胞製剤は、原料採取を院内で行うため、院内採血による製剤ではあるが、製造工場に発送され、加工後に返送されるため、院外製剤としての側面も持ち合わせる。これ以外にも血漿分画製剤と同様の取り扱いが可能な各種再生医療等製品が存在する。

本稿では、輸血部門の特性を生かした血液細胞製剤の管理についてまとめる。

造血幹細胞移植における輸血部門システムの活用

慶應義塾大学病院では、輸血部門システムの運用を1996年から開始しており、現在はオーソ・クリニカル・ダイアグノスティクス株式会社の輸血管理システム BTD®を用いている。総合的に様々な情報を管理していくためには、輸血部門システムと電子カルテの双方向通信により重要な情報がしっかり共有されることが不可欠である。この輸血部門システムは、電子カルテシステムと連携して、輸血関連検査や臨床検査データ(感染症や末梢血血算、凝固データなど)といった「患者データ」と、血漿分画製剤を含む「血液製剤のデータ」を紐づけて管理する。バーコードを用いた入庫や患者照合、そのために必要なラベルや記録用紙類の出力が可能である。さらに投与製剤の記録、副反応の記録をデータベース上に残し、遡及調査などの際の検索にも利用できる。

前述したように輸血部門システムは、細胞製剤の管理にも有用である。すなわち、院内で採取した造血幹細胞や骨髄バンク・さい帯血バンクを介して外部より入手した移植用細胞に新たにロット番号を発行して入庫し、バーコードやラベルを作成する。医師は、電子カルテのオーダーリングシステムから、輸血製剤と同じように細胞製剤のオーダーを入れる(図1)。これにより、通常の血液製剤と同様のコンピューターによる管理が可能になる。慶應義塾大学病院における造血幹細胞のシステム管理の流れを図2に示す。

造血幹細胞移植の細胞取扱いに関するテキスト（第2版）

>第6章 システムによる血液細胞製剤の管理

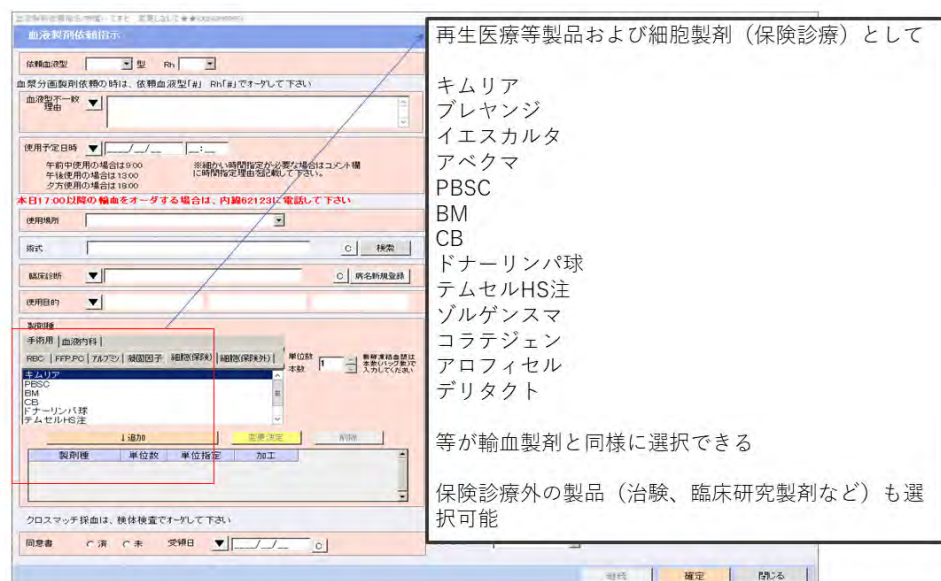


図1 電子カルテ輸血製剤オーダーリングシステム

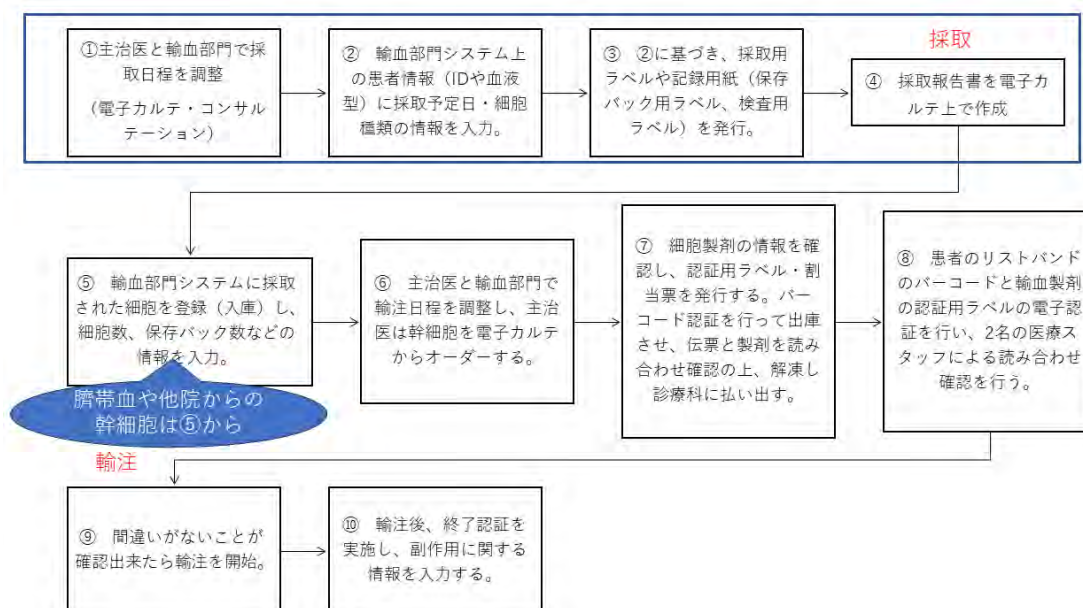


図2 幹細胞採取から投与までのデータ管理の流れ

一方、京都大学病院では、2022年の電子カルテシステム更新に合わせて、輸血部門システムとして、株式会社オネスト製の輸血管理システム RhoOBA を導入した。こちらも、標準装備されている輸血管理および造血幹細胞管理の機能に加え、カスタマイズする形で各種細胞製剤への対応を可能とした。電子カルテシステムと部門システムの双方向通信を行うこ

とで、システム上ですべての行為が完結することを目指している。

いずれの部門システムも、長所・短所を持ち合わせているため、病院の基盤システムとの親和性、また従来用いられていたシステムからのデータ移管の可否、さらには、部門システムに接続すべき各種検査機器の特性などを総合的に勘案し、最適なシステムの導入とカスタマイズが重要である。

再生医療等製品における輸血管理システムの活用

CAR-T 細胞製剤を含む再生医療等製品の取扱いは、2019 年に CAR-T 細胞製剤が保険収載されて以降、飛躍的に増加した。CAR-T 細胞製剤は、自己の細胞を用いた細胞製剤であり、基本的には自己血の管理を応用して輸血管理システムで扱うことが可能であるが、採取後外部機関に出荷し、加工されて自施設に戻ってくる工程において、Chain of Identity をいかに従来システムの中に組み込んでいくかが大きな課題となる(図 3)。

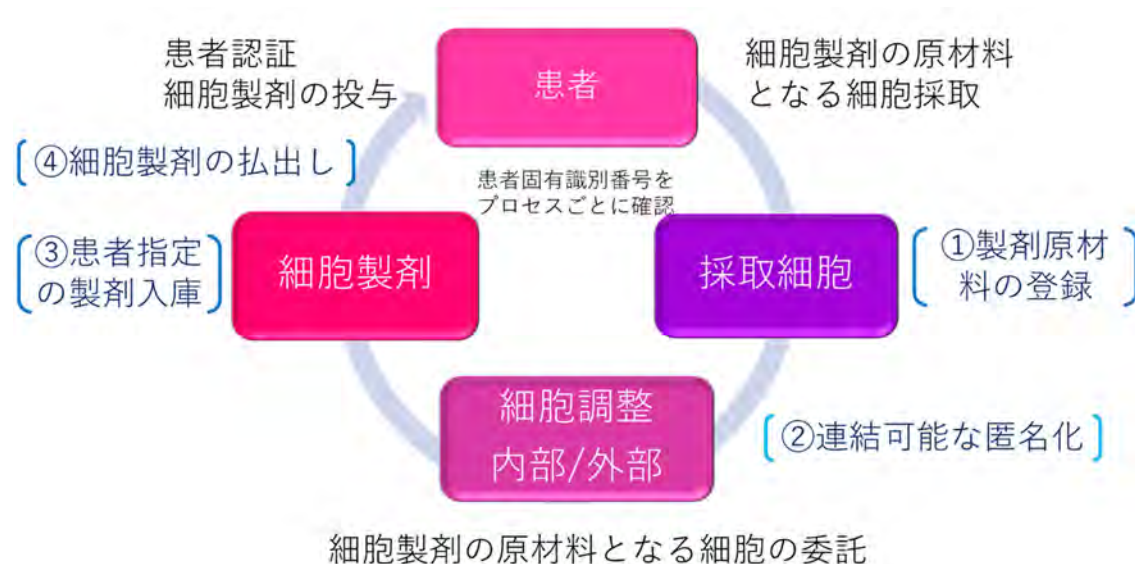


図 3 Chain of Identity

Chain of Identity とは、患者固有の情報により、患者を正しく識別して、各プロセスにおいて患者の同一性を確認して、細胞を採取した患者に該当の細胞由来製品を正しく提供するために、細胞と情報を連結して管理する仕組みのことである(図 3)。各製剤に付与される固有の患者識別番号を患者情報・製剤情報と紐づけて管理し、さらに採取、入庫、出庫、最終製品入庫、製剤投与の各ステップにおいて、適切なラベルやフォーマットを発行しこれによる認証を行う。加えて診療科や製造企業と密に連携してスケジュールを正確に管理することも必要不可欠である。CAR-T 細胞製剤は、現在 CD19-CAR-T として B 細胞性リンパ腫を対象としたキムリア®、イエスカルタ®、プレヤンジ®、BCMA-CAR-T として多発性骨髄腫を対象としたアベクマ®の4種類が国内において承認済みであり、既に多くの施設で実施可能と

造血幹細胞移植の細胞取扱いに関するテキスト（第2版）

>第6章 システムによる血液細胞製剤の管理

なっている。BCMA-CAR-Tとしては、カービクティ®も間もなく使用可能となり、今後も CAR-T 細胞製剤の種類はますます増加することが予想される。採取産物に求められる条件、出荷方法、最終製品の形状や保管方法、投与方法などは製剤によりまちまちである。輸血部門システムによる製剤管理はもちろんのこと、各製剤の SOP の管理システムも各医療機関の運用に即した形で整えていく必要がある。

自施設での凍結保存が必要な CAR-T 細胞製剤における採取から投与までの製剤管理の詳細を図4に示した。

- ① 主治医と輸血部門で採取日程を調整し、診療科からリンパ球採取依頼書を受け取る（電子カルテ上で作成）
- ② 依頼書の情報に基づき、アフエーシスID管理台帳（図4a）を用いて採取1回ごとに固有の**アフエーシスID**を付与する。
- ③ 輸血部門システムに細胞採取の登録をする。「移植/治療用細胞」→「患者別管理」で患者IDを入力、「移植用細胞管理」画面を開く。「外部調整」タブから「採取」を選択し、採取日、アフエーシスID、細胞種類、外部調整先（製造企業）、その他必要な情報を入力する（図4b）。アフエーシスIDは管理台帳のGRコードをスキャンして入力する。
- ④ ②に基づき、当日の採取で用いるラベルや記録用紙（**バック用ラベル、検査用ラベル、細胞処理記録用紙、資材等記録用紙**など）を発行する（図4c）。リンパ球採取後、**採取報告書**を電子カルテ上で作成する。採取細胞数に基づき「委託用枝番発番」から凍結バック数を登録し、凍結バックラベルを出力する。
- ⑤ 細胞を凍結保存する。採取関連記録を電子カルテにスキャンする。
- ⑥ **出荷確認記録**を記載する。製造所へ材料となる細胞を払い出し、輸血部門システムのステータスは「外部調整」となる。
- ⑦ 最終製品が製造所から届いたら、輸血部門システムにて、受け入れ入庫する（図4d）。複数バックある場合は枝番管理をする。細胞製剤のステータスは「調製済み」となる。電子カルテに最終製品の情報をスキャンする。
- ⑧ 主治医と輸血部門で投与日程を調整し、主治医はCAR-T細胞を電子カルテのオーダーリングシステムからオーダーするとともに、「**CAR-T細胞製剤輸注依頼書**」を作成する。
- ⑨ 輸血部門は受け取ったオーダーに基づき、輸血部門システムに登録されている細胞製剤の情報を確認し、**認証用ラベル・割当票**（図4e）を発行する。バーコード認証を行って出庫させ、伝票と製剤を読み合わせ確認の上、解凍する。解凍後再度読み合わせ確認を行い、診療科に払い出す。
- ⑩ 診療科に払い出された細胞製剤は、電子カルテにて患者のリストバンドのバーコードと輸血製剤の認証用ラベルの電子認証を行い、同時に2名の医療スタッフによる読み合わせ確認を行う。間違いがないことが確認出来たら輸注を開始する。
- ⑪ 輸注後、終了認証を実施し、副作用に関する情報を入力する

図4 CAR-T 細胞調製の原料細胞採取から投与までのデータ管理の詳細

再生医療等製剤は、大きくは自己細胞由来製品と、同種細胞由来製品に分けることができる。自己細胞由来製品としては、前出の CAR-T 細胞製剤のほかに、ジャック®(自己軟骨由来細胞)やジェイス®(自己表皮由来細胞シート)、ステミラック®(自己骨髓由来間葉系幹細胞)などがある。これらの製剤も、手術室で細胞を採取(入庫)→院外製造(材料払い出し)→製品受け入れ(入庫)→投与(出庫)という流れで管理可能と考えられ、輸血部門システムによりラベルを発行したうえで製造先に払い出し、製品を患者原料細胞に紐づけて入庫するシステムを今後構築することが必要と考えられる。

テムセル®(ヒト(同種)骨髓由来間葉系幹細胞)・アロフィセル®(ヒト(同種)皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞)などの同種由来の再生医療等製品の場合は、患者特有のドナーが存在しない。ゾルゲンスマ®(ウイルスベクター製品 オナセムノゲン・アベパルボベク)のような遺伝子治療分野の再生医療等製品も同様である。このような製剤においては、血漿分画製剤に類似の管理を行うことになる。この場合も最終的には患者に紐づけてラベル発行を行

い、ベッドサイドで認証し投与を行う。

その他、iPS 由来製剤など、現在臨床研究として患者に投与されている製剤も数多くあるが、これらについても、保険収載されている再生医療等製品と同様に部門システムに登録の上、バーコードラベルを作成し、認証してから投与という一連の流れを構築している。

まとめ

細胞製剤および再生医療等製品を管理するために必要な要件として、次の7つがあげられる。①患者情報管理ができること ②製剤情報管理ができること ③患者と製剤の紐づけができ、投与記録を30年以上保管できること。④患者細胞を原材料としてシステムに登録できること ⑤院外での製品化の際に連結可能な匿名化が可能であること。⑥電子的に患者と製剤の適合性がバーコード認証できること ⑦記録様式、ラベル類のフォーマット作成、出力が可能であること、である。輸血部門システムを用いることで、これらをすべて網羅した安全で適正な管理が可能となる。

各医療機関における取り組みはもちろん重要であるが、国としてバイオビジランス(biovigilance)の体制を整えることも必要である。バイオビジランスとは、血液製剤だけでなく、細胞、組織、臓器を広く対象とした安全監視システムである。すなわち、輸血用血液製剤やその関連製剤、細胞、組織、臓器の採取、および輸注・移植に関して発生した有害事象や結果に関する情報を、網羅的に収集・解析し、報告することにより、輸血や細胞療法の安全性向上を目指すものである¹⁾²⁾。

本稿で触れてきた造血幹細胞移植に用いられる骨髄・末梢血幹細胞・臍帯血、CAR-T細胞製剤、その他の再生医療等製品などは、このバイオビジランスの範疇になる。わが国では現在のところ造血幹細胞の採取・処理・保存・管理・輸注に伴う有害事象を収集・分析・報告する包括的な監視体制はないが、日本骨髄バンクは、非血縁者間骨髄・末梢血幹細胞の採取・処理にかかわるドナー安全情報データベースを日本骨髄バンクウェブサイト(https://www.jmdp.or.jp/donor_safety/)に掲載し、またドナー候補に対する説明パンフレット³⁾にもまとめて掲載している。臍帯血移植については、日本赤十字社が、骨髄バンク・さい帯血バンクポータルサイト(<https://www.bs.jrc.or.jp/bmdc/medicalpersonnel/index.html>)にて、即時型副反応およびドナー由来白血病などの関連有害事象を報告している。

血縁同種造血幹細胞移植のドナー関連有害事象に関しては、日本造血・免疫細胞療学会がドナー保険と関連付けて収集・分析するようになっている。また日本輸血・細胞治療学会細胞療法委員会では、造血幹細胞輸注時の有害事象の前方視的調査研究を実施し、報告している⁴⁾⁵⁾。

CAR-T細胞製剤やテムセル®については、日本造血・免疫細胞療学会のデータセンターによるデータ解析が行われている。また、日本再生医療学会は、「再生医療等データ登録システム(NRMD)」という臨床データ登録システムの構築に取り組んでおり、臨床研究から市販後調査までシームレスに再生医療等製品の安全性と有効性を評価するリアルワールド

ドエビデンスを蓄積、提供している。

造血器腫瘍分野に関わらず、分野横断的に増加してくる再生医療等製品を、いかに国として管理する体制を構築するかは今後の課題である。本稿では、細胞製剤及び再生医療等製品の管理について、慶應義塾大学病院および京都大学病院の電子カルテシステム及び輸血部門システムを用いた方法を紹介した。富士通や Bio-Rad など、その他の輸血部門システムにおいても同様の運用が可能と考えるが、詳細は各システムベンダーにご相談いただきたい。

参考文献

- 1) Sukhjinder S, Shammy C, Phulen S, et al. Biovigilance: A Global Perspective. *Perspect Clin Res*. 2019; 10: 155-162.
- 2) Pruett TL, Blumberg EA, Cohen DJ, et al. A consolidated biovigilance system for blood, tissue and organs: One size does not fit all. *Am J Transplant*. 2012; 12:1099-101.
- 3) ドナーのためのハンドブック第8版 2022年10月
<https://www.jmdp.or.jp/pdf/donation/2022donor-handbook-B4.pdf>
- 4) Ikeda K, Ohto H, Okuyama Y, et al. Adverse events associated with infusion of hematopoietic stem cell products: a prospective and multicenter surveillance study. *Transfus Med Rev*. 2018; 32: 186- 94.
- 5) Ikeda K, Minakawa K, Yamahara K, et al, Comparison of cryoprotectants in hematopoietic cell infusion-related adverse events. *Transfusion*. 2022; 62: 1280-1288.

（執筆者：山崎理絵、新井康之、査読者：藤原実名美）

執筆者一覧

田野崎隆二	慶應義塾大学病院 輸血・細胞療法センター
長村登紀子	東京大学医科学研究所附属病院 セルプロセッシング輸血部/検査部
藤原実名美	東北大学病院 輸血・細胞治療部
池本純子	兵庫医科大学病院 輸血・細胞治療センター
岩木啓太	東北大学病院 輸血・細胞治療部
原口京子	がん・感染症センター 都立駒込病院 輸血・細胞治療科
池田和彦	福島県立医科大学附属病院 輸血・移植免疫部
吉原 哲	兵庫医科大学病院 血液内科／輸血・細胞治療センター
新井康之	京都大学医学部附属病院 血液内科・細胞療法科
山崎理絵	慶應義塾大学病院 輸血・細胞療法センター
上田恭典	倉敷中央病院 血液内科・血液治療センター
村田真由美	倉敷中央病院 血液内科・血液治療センター
高橋敦子	東京大学医科学研究所附属病院 セルプロセッシング・輸血部
尾上和夫	東京大学医科学研究所附属病院 セルプロセッシング・輸血部
大原喜裕	福島県立医科大学附属病院 小児腫瘍内科
城 友泰	京都大学医学部附属病院 血液内科・細胞療法科
奥山美樹	がん・感染症センター 都立駒込病院 輸血・細胞治療科
岸野光司	自治医科大学附属病院 輸血・細胞移植部
五十嵐靖浩	慶應義塾大学病院 輸血・細胞療法センター

日本輸血・細胞治療学会 造血幹細胞移植関連委員会

「院内における血液細胞処理のための指針」および

「造血幹細胞移植の細胞取扱に関するテキスト」改訂

タスクフォース メンバー一覧

吉原哲*、新井康之**、上田恭典、尾上和夫、奥山美樹、亀崎健次郎、
岸野光司、高梨美乃子、田野崎隆二、長村登紀子（担当理事）、藤原実名美
（*委員長、**副委員長）

造血幹細胞移植の細胞取扱に関するテキスト（第2版）

2025年3月版

編集：新井康之（京都大学医学部附属病院 血液内科・細胞療法科）

編集協力：中村佳奈子（京都大学医学部附属病院 細胞療法センター）