

## アフェレーシス前日 CD3 陽性細胞測定による CAR-T リンパ球採取戦略構築

島 隆宏<sup>1)~3)\*</sup> 石原 大輔<sup>1)\*</sup> 仙波雄一郎<sup>1)2)5)</sup> 山中 育未<sup>1)4)</sup> 平安山知子<sup>1)2)</sup>  
水野 晋一<sup>3)</sup> 國崎 祐哉<sup>2)4)</sup> 前田 高宏<sup>2)5)</sup> 赤司 浩一<sup>1)2)4)</sup>

キメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor : CAR)-T 細胞療法において、十分な細胞数の採取が重要である。しかし前治療や原疾患によって末梢血中のリンパ球数が減少していることも多く、処理血液量の過不足が課題である。本研究では CAR-T 製造を目的としてアフェレーシスを実施した 108 例を対象に、前日の末梢血 CD3 陽性細胞数および単核球中 CD3 陽性細胞割合と、アフェレーシス産物の CD3 陽性細胞数との関連を解析した。CD3 陽性細胞数の逆数を用いた単回帰モデルにより、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫に対する Tisagenlecleucel 製造に必要な CD3 陽性細胞数 ( $1.5 \times 10^9$  cells) を得るための適正な処理血液量が予測可能であった。さらに、前日末梢血単核球中 CD3 陽性細胞割合とアフェレーシス産物の CD3 陽性細胞割合の間にも強い相関が認められ、アフェレーシス前日の検査値に基づく実用的な採取戦略の構築が可能となった。本手法は CAR-T 療法におけるアフェレーシス計画の個別化と標準化を支援し得る可能性があるが、さらなる検討を要する。

キーワード：CAR-T 細胞療法、リンパ球アフェレーシス、CD3 陽性細胞、血液処理量予測

## 背 景

キメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor : CAR)-T 細胞療法は、急性リンパ性白血病、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫などの難治性造血器悪性腫瘍に対する革新的治療法として近年急速に普及している<sup>1)2)</sup>。CAR-T 細胞製造において、末梢血リンパ球のアフェレーシスが初期ステップとして必要であり、その後 CD3 陽性細胞の選択と刺激、CAR 遺伝子の導入、in vitro での拡大培養が行われる<sup>3)</sup>。このアフェレーシスは製剤製造の第一段階であり、CAR-T 療法の成否を左右する極めて重要なプロセスである<sup>3)4)</sup>。

CAR-T 療法の対象患者は化学療法や原疾患により正常リンパ球数が著しく減少していることが多い<sup>5)</sup>。特に Tisagenlecleucel (Tisa-cel) では、所定量の CD3 陽性細胞採取が製造要件である<sup>6)</sup>。適切な処理血液量やアフェレーシス時間の決定にはアフェレーシス中に得られるアフェレーシス産物の CD3 陽性細胞数の実測が理想であるが、Flow cytometry (FCM) 解析には人的資源と

1~2 時間の時間を要し、リアルタイムでの判断は困難である。また、患者の状態に応じた適切な処理量を事前に見積もるための明確な指標は確立されておらず、採取施設の経験に依存した計画立案を余儀なくされている。その結果、過剰な採取または目標量に満たない採取が行われるリスクを伴う。

これらの課題を解決すべく、我々は過去にアフェレーシス前日の末梢血 CD3 陽性細胞数とアフェレーシス産物の CD3 陽性細胞数との相関を報告したが、28 症例と症例数が少なく、実用的な活用にはさらなる検証が必要であった<sup>7)</sup>。そこで本研究では、九州大学病院における 108 例のアフェレーシス症例データをもとにアフェレーシス前日の検査値から必要処理量を予測する実用的な推定式を構築した。

## 対象と方法

## 1. 対象患者

2019 年 10 月から 2023 年 9 月の間に九州大学病院に

1) 九州大学病院血液・腫瘍・心血管内科

2) 九州大学病院遺伝子・細胞療法部

3) 九州大学病院先端分子・細胞治療科

4) 九州大学病院検査部

5) 九州大学大学院プレジジョン医療学

\*共同第一著者

連絡責任者：島 隆宏, E-mail : shima.takahiro.993@m.kyushu-u.ac.jp

〔受付日：2025 年 6 月 12 日, 受理日：2025 年 8 月 4 日〕

Table 1 患者背景

年齢 (歳), 中央値 (範囲)	60 (18 ~ 76)
性別, 男性/女性	65/43
体重 (kg), 中央値 (範囲)	60.9 (41.2 ~ 106.0)
原疾患	
びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫	85
急性リンパ性白血病	8
多発性骨髄腫	11
その他の B 細胞リンパ腫	4
CAR-T 製剤	
Tisagen lecleucel	77
Axicabtagene ciloleucel	20
Idecabtagene vicleucel	11
末梢血データ (アフエレーシス前日)	
白血球数 ( $\mu\text{l}$ ), 中央値 (範囲)	4,020 (1,100 ~ 20,600)
ヘモグロビン (g/dl), 中央値 (範囲)	9.6 (6.6 ~ 14.8)
ヘマトクリット (%), 中央値 (範囲)	28.8 (20.9 ~ 33.75)
血小板数 ( $\mu\text{l}$ ), 中央値 (範囲)	13.2 (1.9 ~ 88.0)
CD3 陽性リンパ球数 ( $\mu\text{l}$ ), 中央値 (範囲)	676 (121 ~ 3,136)

において保険診療の CAR-T 療法目的でアフエレーシスを施行された 183 例のうち、アフエレーシス前日の CD3 陽性細胞数が FCM により測定・記録されていたのは 155 例であった。小児は通常成人と比して採取効率が低く、血液処理量も大きく異なる。また Liso-cel は血漿採取量が総産物量に加わるため、他の CAR-T 採取と処理過程が異なる。従って本研究では全 155 例のうち、小児症例と Liso-cel を行った計 47 例を除外した 108 例を解析対象とした。患者背景、血算、CD3 陽性細胞数、処理血液量、アフエレーシス時間、アフエレーシス産物の CD3 陽性細胞数を電子カルテより抽出した。本研究は九州大学病院臨床研究審査委員会の承認 (22102-03/23311-00/24205) を得て実施した。

## 2. アフエレーシス方法

全症例でアフエレーシスは Spectra Optia (Terumo BCT) を用い、連続式単核球採取 (CMNC) モードを使用して実施された。採血流量は患者毎に 70~80ml/分の一定速度で行い、採取ポンプ流量は全例 1.2ml/分で行った。

## 3. 単核球領域および CD3 陽性細胞の測定・解析方法

各サンプル中の単核球 (mononuclear cells : MNC) 領域は、FCM において forward scatter (FSC) と side scatter (SSC) の二次元プロット上で典型的なサイズおよび内部構造に基づき同定・ゲーティングし、その全体における割合を算出した<sup>8)</sup>。さらに MNC 領域内の CD3 陽性細胞の割合は、抗 CD3 抗体を用いた染色により、各領域内の CD3 陽性イベント数から算出した。これらの得られた割合を各サンプルの細胞数に乗ずることで CD3 陽性細胞数を算出した：CD3 陽性細胞数 = 白血球数  $\times$  MNC 領域 (%)  $\times$  MNC 中の CD3 陽性細胞割合

(%)。

## 4. 統計解析

各因子とアフエレーシス産物の CD3 陽性細胞数との相関係数を算出し、最も高い相関を示す因子を特定した。加えて、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (diffuse large B-cell lymphoma : DLBCL) に対する Tisa-cel 製造において一つの目標とされる CD3 陽性細胞数 ( $1.5 \times 10^9$  cells)<sup>6)9)</sup> を得るために必要な処理量を、アフエレーシス前日の CD3 陽性細胞数を用いた線形回帰にて推定した。CD3 陽性細胞数が多いほど処理量が少なくて済むという非線形性を考慮し、アフエレーシス前日 CD3 陽性細胞数  $X$  (cells/ $\mu\text{l}$ ) の逆数 ( $1/X$ ) を説明変数として単回帰モデルを構築し、以下の式で目的変数  $Y$  (必要処理量) を予測した： $Y = (a/X) + b$  ( $a$  : 回帰係数,  $b$  : 切片)。回帰分析は Python 3.9 および Scikit-learn (v1.6.1) を用いて実施し、seaborn (v0.13.2) と matplotlib (v3.10.0) により散布図および回帰曲線を可視化した。回帰曲線の平滑化のため、CD3 陽性細胞数の昇順にデータを並べ替え、再計算した予測値を用いた。モデルの適合度は決定係数 ( $R^2$ ) により評価した。統計解析は GraphPad Prism (v10) を用いて行い、 $p$  値が 0.05 未満を統計学的に有意とした。

## 結 果

### 1. 患者背景

患者背景を Table 1 に示す。年齢中央値は 60 歳 (範囲 : 18~76 歳)、性別は男性 65 例、女性 43 例であった。体重中央値は 60.9kg (41.2~106.0kg) であり、若年者から高齢者、肥満患者など多様な患者が含まれていた。

疾患別の内訳は DLBCL 85 例 (78.7%)、急性リンパ性白血病 8 例 (7.4%)、多発性骨髄腫 11 例 (10.2%)、

Table 2 リンパ球アフェレーシスの実際

血液量処理量 (ml), 中央値 (範囲)	9,387 (5,152 ~ 16,250)
血液処理時間 (分), 中央値 (範囲)	162 (88 ~ 252)
採取 CD3 陽性細胞数 ( $\times 10^9$ cells), 中央値 (範囲)	3.07 (1.02 ~ 12.87)

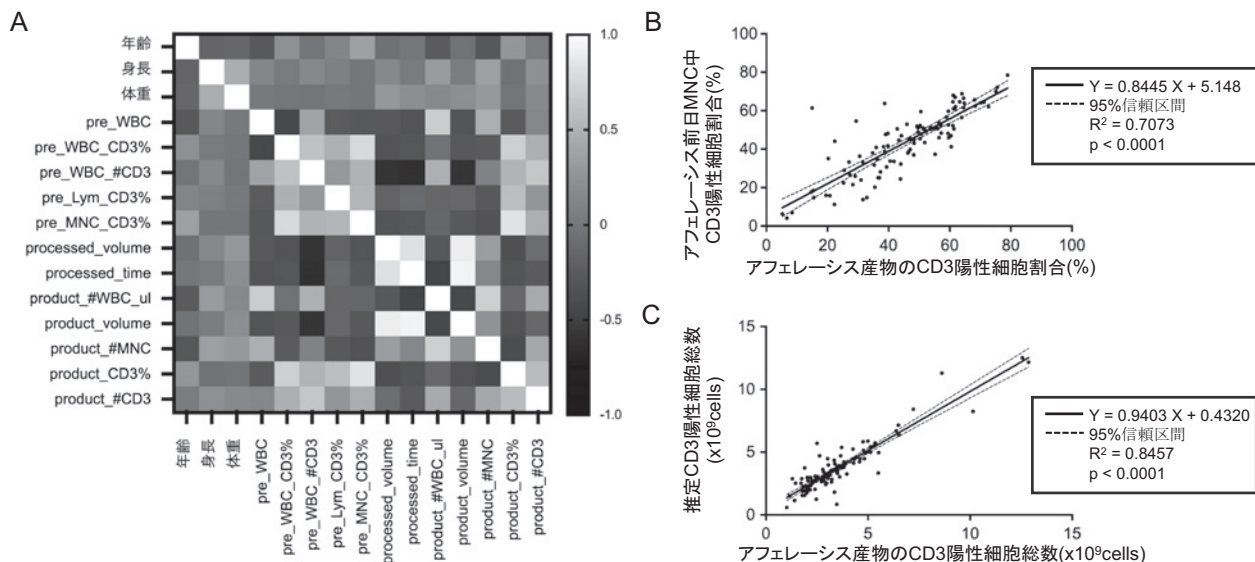


Fig. 1 (A) 各臨床パラメータの相関 各臨床パラメーターの相関係数をヒートマップで表示した. pre\_WBC: アフェレーシス前日末梢血中の白血球数 ( $/\mu\text{l}$ ), pre\_WBC\_CD3%: アフェレーシス前日末梢血中の CD3 陽性細胞割合 (%), pre\_WBC\_#CD3: アフェレーシス前日末梢血中の CD3 陽性細胞数 ( $/\mu\text{l}$ ), pre\_Lym\_CD3%: アフェレーシス前日末梢血リンパ球中の CD3 陽性細胞割合 (%), pre\_MNC\_CD3%: アフェレーシス前日末梢血単核球分画中の CD3 陽性細胞割合 (%), processed volume: アフェレーシス処理血液量 (ml), processed time: アフェレーシス時間 (分), product\_#WBC\_ul: アフェレーシス産物  $1/\mu\text{l}$  あたりの白血球数 ( $/\mu\text{l}$ ), product\_volume: アフェレーシス産物量 (ml), product\_#MNC: アフェレーシス産物の単核球数, product\_CD3%: アフェレーシス産物の CD3 陽性細胞割合 (%), product\_#CD3: アフェレーシス産物の CD3 陽性細胞総数. (B) アフェレーシス産物の CD3 陽性細胞割合とアフェレーシス前日の単核球中の CD3 陽性細胞割合の相関 MNC: mononuclear cells. (C) アフェレーシス産物の CD3 陽性細胞総数と推定 CD3 陽性細胞数の相関

その他の B 細胞リンパ腫 4 例であった. 使用された製剤は Tisa-cel 77 例 (71.3%), Axicabtagene ciloleucel 20 例 (18.5%), Idecabtagene vicleucel 11 例 (10.2%) であった. アフェレーシス前日の末梢血データでは, 白血球数中央値は  $4,020/\mu\text{l}$  ( $1,100 \sim 20,600$ ), CD3 陽性細胞数中央値は  $676/\mu\text{l}$  ( $121 \sim 3,136$ ), ヘモグロビン中央値は  $9.6\text{g/dl}$  ( $6.6 \sim 14.8$ ), 血小板数中央値は  $13.2$  万  $/\mu\text{l}$  ( $1.9$  万  $\sim 88.0$  万) であった.

## 2. アフェレーシスの実施内容

処理血液量の中央値は  $9,387\text{ml}$  ( $5,152 \sim 16,250\text{ml}$ ), 処理時間中央値は 162 分 ( $88 \sim 252$  分) であった. 採取された CD3 陽性細胞総数の中央値は  $3.07 \times 10^9$  cells ( $1.02 \times 10^9 \sim 12.87 \times 10^9$ ) であり, DLBCL に対する Tisa-cel 製造における目標値である  $1.5 \times 10^9$  cells を上回る症例は 103 例 (95.4%) であった (Table 2).

## 3. アフェレーシス前日 CD3 測定による適切処理血液量の予測

アフェレーシスで適正な細胞数を得るための適切処

理血液量を予測するために, まず各臨床パラメータの相関係数を算出した (Fig. 1A). 既報<sup>7)</sup>と同様に, アフェレーシス前日の白血球中の CD3 陽性細胞の割合および CD3 陽性細胞数と, アフェレーシス産物の CD3 陽性細胞の割合や CD3 陽性細胞総数は有意な相関を示した. 中でも, アフェレーシス前日末梢血の MNC における CD3 陽性細胞割合とアフェレーシス産物の CD3 陽性細胞割合に正の相関 ( $R^2 = 0.7073$ ,  $p < 0.0001$ ) を認めた (Fig. 1A, 1B) ことから「アフェレーシス産物の細胞総数 (cells)  $\times$  前日の MNC 中 CD3 陽性細胞割合 (%)」によりアフェレーシス産物の実際の CD3 陽性細胞総数が推定可能かを検証し, 両者に良好な相関を認めた ( $R^2 = 0.8457$ ,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 1C).

さらに同一患者内における処理血液量とアフェレーシス産物の CD3 陽性細胞数は理論上比例すると仮定し, DLBCL に対する Tisa-cel 製造における目標値のひとつである  $1.5 \times 10^9$  個の CD3 陽性細胞を得るために必要な処理血液量を求めた. この処理血液量 (Y) とアフェレー



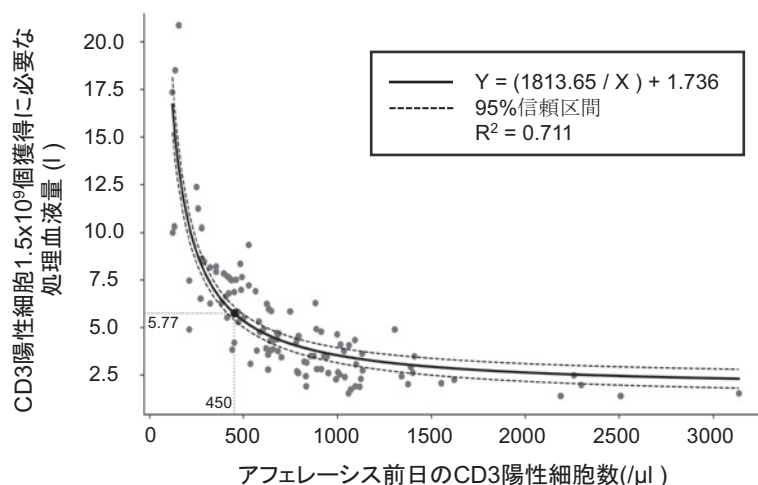


Fig. 2 アフェレーシス前日の末梢血中 CD3 陽性細胞数と目標 CD3 陽性細胞数獲得に必要な処理血液量の近似式

シス前日 CD3 陽性細胞数 (X) の逆数との間に線形関係が認められ、以下の推定式を得た： $Y(L) = 1813.65 / X (\mu l) + 1.736$ .

例えばアフェレーシス前日の末梢血中 CD3 陽性細胞数が  $450/\mu l$  であれば、必要処理血液量は 5.766 (5.766 ml) と算出され、1 分あたり 80ml の脱血速度では 72.1 分で目標に達すると推定される (Fig. 2).

## 考 察

本研究は、CAR-T リンパ球アフェレーシスの戦略的最適化を目的として、アフェレーシス前日の末梢血中 CD3 陽性細胞数および MNC 中の CD3 陽性細胞割合と、アフェレーシス産物の CD3 陽性細胞数との関連を 108 例という比較的大規模なデータをもとに検討した。我々の先行研究<sup>7)</sup>においてもアフェレーシス前の CD3 陽性細胞数と産物の CD3 陽性細胞数との間に相関を示したが症例数は限られており、より大規模な検証が求められていた。本研究の意義は、実臨床に即した多様な背景を持つ症例群を対象とし、簡便かつ高精度な処理血液量の推定式を提示した点にある。

本推定式は、臨床現場において複数の利点を提供し得る。第一に、処理量の事前見積りにより、アフェレーシス時間短縮や不要な血球減少の回避が期待される。特に高齢者、低体重者、血小板減少を伴う患者においては、不要な過剰処理を避けることが極めて重要である<sup>10)</sup>。アフェレーシスの実施に際しては、途中で産物をサンプリングし CD3 陽性細胞数を測定する方法や、実施直前の末梢血 CD3 陽性細胞数を用いた評価も提案されている<sup>7)11)12)</sup>。しかしアフェレーシス当日の朝や処理中に複数回 FCM を行うには人的・時間的制約が伴い、リアルタイムでの運用が困難な場合もある<sup>13)</sup>。従って、前日の CD3 陽性細胞数に基づいて予め目標細胞数の確

保に必要な処理量を推定できれば、アフェレーシスの実施可否を含む計画立案において大きな利点となる。アルゴリズムの簡便さの観点からは、アフェレーシス前日の末梢血 MNC 領域ではなく、末梢血全体における CD3 陽性細胞割合を用いることも考慮した。しかしアフェレーシスは血液細胞の MNC 領域を採取しており、末梢血全体の CD3 陽性細胞割合が同じ患者同士でも、MNC 領域の割合が異なれば採取される CD3 陽性細胞数は異なる。事実、アフェレーシス前日の末梢血全体の CD3 陽性細胞割合とアフェレーシス産物の CD3 陽性細胞割合との決定係数は  $R^2=0.47$  と決して良好ではなかった (Fig. 1A)。従って今回我々は、前日の末梢血 CD3 陽性細胞割合ではなく、MNC 領域における CD3 陽性細胞割合をアフェレーシス産物の CD3 陽性細胞割合として代用し、アフェレーシスを進めるアルゴリズムを提唱するに至った。なお、MNC 領域割合の測定は通常の FCM 検査で得られる FSC と SSC によるゲーティングをもとに可能であり、過剰に複雑な解析プロセスを要しないことも利点と考える。

本研究では多様な CAR-T 製剤および適応疾患を含む症例を対象に解析を行った結果、CD3 陽性細胞数の逆数を用いた単回帰モデルにより Tisa-cel の製造に必要な  $1.5 \times 10^9$  個の CD3 陽性細胞を得るための処理血液量を高精度で予測可能な式を構築することができた。例えば、 $CD3 = 450/\mu l$  の症例においては、約 5.77l の処理により目標細胞数が得られると推定され (Fig. 2)、実際の採取結果とも良好な一致を示した。ただし、Fig. 2 に示されるように、同一の CD3 陽性細胞数であっても推定値から外れる症例が存在し、これは処理流量の変動、体格差、全身状態、あるいは前治療による MNC 割合やリンパ球数の影響など複合的な要因が関与していると考えられる。今後は、本予測式を前向きに検証し、実用性

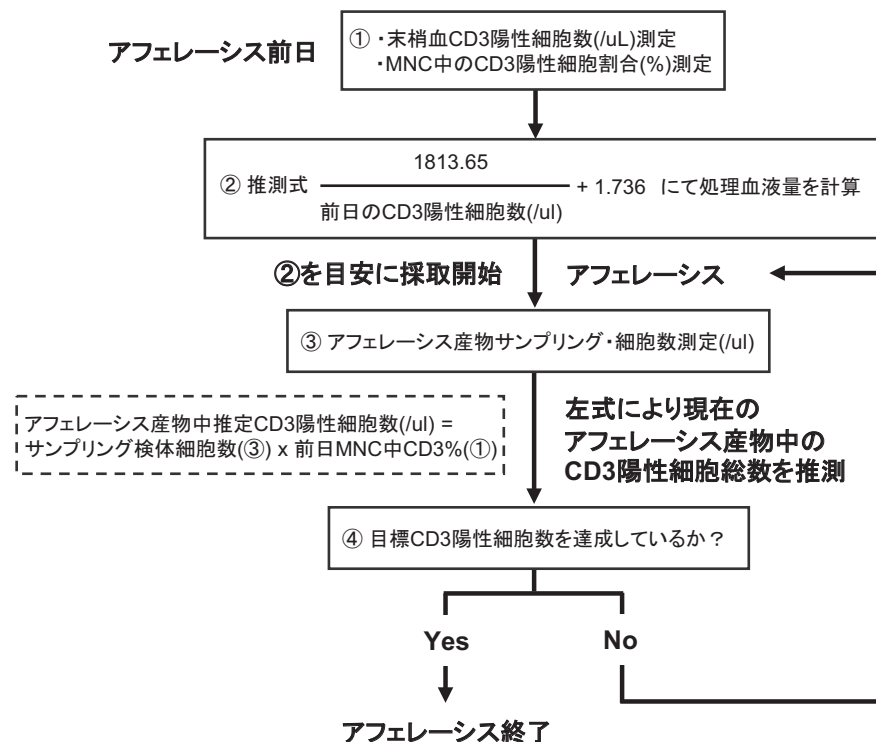


Fig. 3 アフェレーシス戦略の最適化アルゴリズム MNC: mononuclear cells.

および精度のさらなる向上を目指す必要がある。

加えて、アフェレーシス前日の MNC 中 CD3 陽性細胞割合はアフェレーシス産物の CD3 陽性細胞割合とも強い相関を示しており (Fig. 1B)、アフェレーシス産物サンプリング検体の細胞数との組み合わせにより CD3 陽性細胞総数を推定可能であることが示唆された (Fig. 1C)。これらの知見を踏まえ、我々は Tisa-cel におけるアフェレーシス戦略の最適化アルゴリズムとして以下を提案する (Fig. 3)：

- ① 前日に末梢血 CD3 陽性細胞数を測定
- ② 予測式に基づき必要処理血液量を算出しアフェレーシス開始
- ③ 処理途中で産物をサンプリングし細胞数を測定
- ④ 前日 MNC 中の CD3 陽性細胞割合と併せて CD3 陽性細胞総数を再推定し、目標達成に向けて処理量・時間を調整

なお、本研究には複数の限界も存在する。第一に、単施設での後方視的解析であるため、他施設や異なる装置・測定法において同様の精度が得られるかは不明である。第二に、本予測式は前向きに検証されておらず、アフェレーシス設計に実装した際の臨床アウトカムへの影響は今後の課題である。第三に、製剤製造成績や治療転帰 (奏効率、効果持続、有害事象) と CD3 採取量との関係性は本研究では未検討である。それでもなお、本研究は前日 CD3 陽性細胞数という客観的かつ測定容易な指標を用いて、CAR-T 細胞療法における

アフェレーシス計画の標準化および個別最適化に寄与する実用的かつ汎用性の高い戦略を提示している。今後、多施設共同での前向き検証および製剤製造成績との関連解析を通じて、本予測モデルの外的妥当性と臨床的有用性をさらに高めていくことが期待される。

## 結 語

アフェレーシス前日の末梢血 CD3 陽性細胞数および MNC 中 CD3 陽性細胞割合を用いた多角的予測手法は、CAR-T 細胞療法におけるリンパ球アフェレーシス戦略の個別最適化と標準化を推進する実用的手段となる可能性がある。

著者の COI 開示：島隆宏：講演料 (ギリアド・サイエンシズ, ブリストルマイヤーズスクイブ), 前田高宏：講演料 (ブリストルマイヤーズスクイブ), 赤司浩一：講演料 (ギリアド・サイエンシズ, ブリストルマイヤーズスクイブ, ノバルティスファーマ)

謝辞：本研究に協力いただいた九州大学病院 血液・腫瘍・心血管内科、遺伝子・細胞療法部、先端分子・細胞治療科、検査部の皆様に深謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al: Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*. 371 (16): 1507—1517, 2014. doi: 10.1056/NEJMoa1407222.

- 2) Schuster SJ, Svoboda J, Chong EA, et al: Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med*, 377 (26): 2545—2554, 2017. doi: 10.1056/NEJMoa1708566.
- 3) Levine BL, Miskin J, Wonnacott K, Keir C: Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 4: 92—101, 2017. doi: 10.1016/j.omtm.2016.12.006.
- 4) Turtle CJ, Hanafi L-A, Berger C, et al: CD19 CAR-T cells of defined CD4+: CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest*, 126 (6): 2123—2138, 2016. doi: 10.1172/JCI85309.
- 5) Brudno JN, Kochenderfer JN: Chimeric antigen receptor T-cell therapies for lymphoma. *Nat Rev Clin Oncol*, 15 (1): 31—46, 2018. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.128.
- 6) O'Leary MC, Lu X, Huang Y, et al: FDA Approval Summary: Tisagenlecleucel for Treatment of Patients with Relapsed or Refractory B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Cancer Res*, 25 (4): 1142—1146, 2019. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-2035.
- 7) Yamanaka I, Yamauchi T, Henzan T, et al: Optimization of lymphapheresis for manufacturing autologous CAR-T cells. *Int J Hematol*, 114 (4): 449—458, 2021. doi: 10.1007/s12185-021-03191-x.
- 8) Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R: Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol*, 12 (3): 191—200, 2012. doi: 10.1038/nri3158.
- 9) Jalowiec KA, Pabst T, Bocksrucker C, et al: How to Collect the Minimum-Targeted CD3+ Cells for CAR-T Therapy- the Bern Approach. *Blood*, 134 (Supplement\_1): 2457—2457, 2019. doi: 10.1182/blood-2019-126534.
- 10) Korell F, Laier S, Sauer S, et al: Current Challenges in Providing Good Leukapheresis Products for Manufacturing of CAR-T Cells for Patients with Relapsed/Refractory NHL or ALL. *Cells*, 9 (5): 2020. doi: 10.3390/cells9051225.
- 11) 山崎理絵, 上村知恵, 五十嵐靖浩, 他: 自動血球分析装置を用いた効率的な CAR-T 細胞療法用リンパ球採取予測法の検討. *日本輸血細胞治療学会誌*, 69 (1): 8—14, 2023.
- 12) Wada F, Jo T, Arai Y, et al: T-cell counts in peripheral blood at leukapheresis predict responses to subsequent CAR-T cell therapy. *Sci Rep*, 12 (1): 18696, 2022. doi: 10.1038/s41598-022-23589-9.
- 13) Chabannon C, Larghero J: Considerations pertaining to cell collection and administration of industry-manufactured autologous CAR-T cells, in relation to French healthcare organization and regulations. *Curr Res Transl Med*, 66 (2): 59—61, 2018. doi: 10.1016/j.retrm.2018.03.002.

## PRE-APHERESIS CD3-GUIDED APHERESIS STRATEGY FOR CAR-T THERAPY

Takahiro Shima<sup>1)~3)\*</sup>, Daisuke Ishihara<sup>1)\*</sup>, Yuichiro Semba<sup>1)2)5)</sup>, Ikumi Yamanaka<sup>1)4)</sup>, Tomoko Henzan<sup>1)2)</sup>, Shinichi Mizuno<sup>3)</sup>, Yuya Kunisaki<sup>2)4)</sup>, Takahiro Maeda<sup>2)5)</sup> and Koichi Akashi<sup>1)2)4)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Hematology, Oncology and Cardiovascular Medicine, Kyushu University Hospital

<sup>2)</sup>Center for Cellular and Molecular Medicine, Kyushu University Hospital

<sup>3)</sup>Department of Advanced Molecular and Cell Therapy, Kyushu University Hospital

<sup>4)</sup>Department of Clinical Laboratory Medicine, Kyushu University Hospital

<sup>5)</sup>Division of Precision Medicine, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences

\*These authors contributed equally to this work.

### Abstract:

Lymphocyte apheresis is a critical initial step in chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy. However, reduced peripheral blood CD3<sup>+</sup> cell counts due to prior treatment or underlying disease can make it difficult to determine the appropriate blood volume to process. In this retrospective study, we analyzed 108 patients who underwent apheresis for CAR-T manufacturing. We investigated the relationship between CD3<sup>+</sup> cell counts and percentages in peripheral blood on the day prior to apheresis and the number of CD3<sup>+</sup> cells collected in the final product. A linear regression model using the inverse of the CD3<sup>+</sup> cell count allowed us to estimate the blood volume required to achieve the target CD3<sup>+</sup> cell dose ( $1.5 \times 10^9$  cells) for Tisagenlecleucel production in diffuse large B-cell lymphoma. We also found a strong correlation between CD3<sup>+</sup> cell percentage in pre-apheresis mononuclear cells and CD3<sup>+</sup> cell content in the apheresis product. These findings suggest that pre-apheresis CD3<sup>+</sup> cell measurement can be used to construct a practical and individualized collection strategy, and help standardize and optimize lymphocyte harvesting in CAR-T cell therapy.

### Keywords:

CAR-T cell therapy, lymphocyte apheresis, CD3-positive cells, processing blood volume prediction