Japanese Society for Apheresis

日本アフェレシス学会雑誌 17(1):29-33, 1998

総　説

末梢血幹細胞動員および採取方法の発達

河野嘉文*・高上洋一**

*徳島大学医学部小児科，**国立がんセンター中央病院薬物療法部

Mobilization and Harvesting of Peripheral Blood Stem Cell for Transplantation: An Updated Procedure

Yoshifumi Kawano* and Yoichi Takaue**

*Department of Pediatrics, University of Tokushima, **Hematopoietic Stem Cell Transplant Unit, National Cancer Center Hospital

Summary Autologous peripheral blood cell transplantation (PBSCT) has been established as a procedure for hematopoietic stem cell rescue after marrow ablative chemoradiation therapy for patients with high-risk malignant diseases. To make a strategy for cancer treatment combined with PBSCT, the establishment of effective mobilization and harvesting protocol will be a key factor, and it must be updated according to the development of drugs or medical devices. We showed here that PBSC mobilization by G-CSF alone, even in pretreated patients whose PBSC were not effectively mobilized by chemotherapy plus G-CSF, can be induced as a practical method, and that this will make the clinical management of patients easier. Further, a newly developed special chamber for apheresis is quite effective for harvesting PBSCs from small children. These procedures can be applied for future gene therapy targeting pediatric patients and donors.

Key words: peripheral blood stem cell transplantation, G-CSF, apheresis, mobilization

1. 緒　　言

自家末梢血幹細胞移植術（PBSCT）は難治性癌の治療計画の中で，大量化学療法や放射線療法後の造血幹細胞救済療法として実施されている[1,2]．当初はアフェレシスによる細胞採取および凍結保存を必要とすることで，白血病治療を専門とする一部の施設でのみ行われていた．その後，サイトカイン特にG-CSFの併用による効率的な末梢血幹細胞（PBSC）動員方法が開発されたこと，採取後の細胞凍結保存方法の簡略化が確立されたこと，さらに移植手技が本邦で保険適応になったことなどの理由により，現在では癌治療を行う第一線の臨床病院でも広く実施されている．

アフェレシスによるPBSC採取は，自家骨髄移植術（BMT）の際に実施される全身麻酔下での骨髄細胞採取に比較すると非侵襲的であり，必要量に達するまで繰り返し採取できる点で自家BMTより実践的である．しかし，多彩な疾患および治療経過を有する癌患者個々について，確実にPBSCを動員・採取する方法が確立されたわけではない．特に，採取PBSCに癌細胞が混入することがPBSCT後の再発につながるのではないかという懸念もある[3,4]．最近では微少残存腫瘍細胞（MRD）に関する研究が行われているが，現段階では一部の白血病を除いて結論は得られていない．これについては多くのPBSCT施行症例で長期的な経過観察がなされて初めて結論が導かれると思われる．現段階ではMRDの検索を併用してPBSCTを実施することと，可能な限り体内の腫瘍細胞を減少させてから採取すること（*in vivo* purging）が治療上重要であると思われる．本稿では癌患者からのアフェレシスに関する現状を概説する．

2. PBSC動員方法と採取時期

PBSC動員方法としては，図1に示したように3種類の方法がある．以下にそれぞれの特徴を説明する．

2.1 化学療法によるPBSC動員

G-CSFなどのサイトカインが臨床応用される以前は，効率的にPBSC採取ができる時期は化学療法後の骨髄回復期に限られていた．したがって，どのような化学療法剤を使用するとPBSC動員がうまくいくかどうか多くの報告がなされた[5,6]．しかし，化学療法だけで動員採取する方法は，図1（上段：A）のよ

NII-Electronic Library Service

Japanese Society for Apheresis

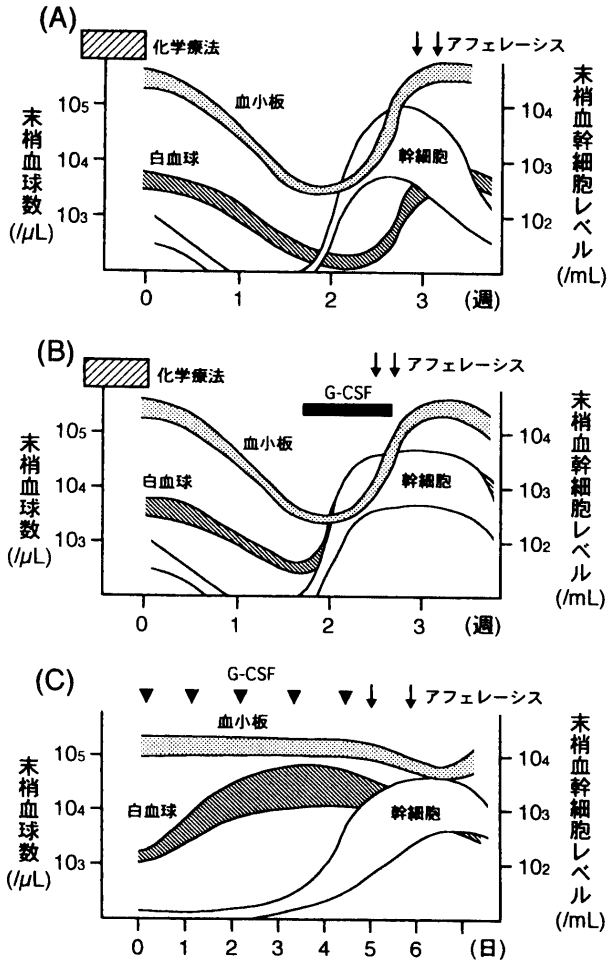

図1　末梢血幹細胞動員方法の種類と特徴

化学療法のみによる動員(A)，化学療法＋G-CSF による動員(B)，およびG-CSF 単独動員(C)の3種類があり，細胞の動態が異なる．

うにPBSCのピークは一過性で，採取時期を少しでもずらせると，採取量は極端に低下していた．そこで，PBSCのアフェレシスによる採取には経験が必要で，日々の末梢血細胞の観察も重要であった．われわれの施設では，この方法で白血球数が2,000～3,000/μl，血小板数が10万/μlに達する時期がもっとも適切な採取時期と考えていた．現在でもG-CSF受容体をもつ腫瘍では化学療法だけで動員採取すべきであるという意見も聞かれるが，これは内因性G-CSF分泌動態を無視した意見のように思える．通常の強化化学療法後の骨髄回復期の内因性G-CSF量は，図2に示すごとく非常に高値になるので，常用量のG-CSF投与に慎重になる必要はないのではないかと考えている．

2.2　化学療法＋G-CSF併用動員

本邦で白血球増加因子としてG-CSFが臨床応用されてからは，化学療法後の骨髄回復期に，通常は白血球数がnadir（500/μl程度）になった時点からG-

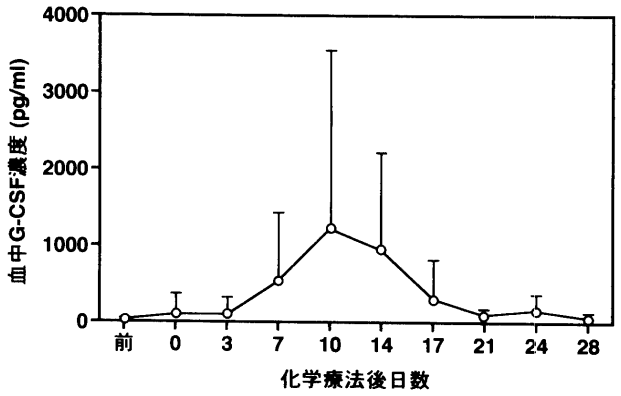

図2　化学療法後の骨髄回復期の血中G-CSF濃度の変化（$n=6$）

化学療法後に白血球数が減少するとともにG-CSFの濃度は増加し，白血球数の増加とともに急速に低下する．図は大量Ara-C療法をうけた6小児例の経過を示した．

CSFの投与を開始するようになった．これにより従来は採取が困難であると思われていた症例でもPBSCが十分量採取できるようになったことは事実である[7]．その後の臨床検討結果から，G-CSFの投与は白血球数の回復促進とPBSCが動員されたあとのピーク値を持続できる効果があることが判明し，アフェレシスによって採取できる期間が長くなった．これは臨床現場にもたらす実践的効果として非常に大きく，日常診療のスケジュールにある程度合わせた採取が可能になったと言える．

しかし，実際には白血球数の回復速度は実施された化学療法の内容によって決定されることも多く，固形腫瘍と血液腫瘍とではG-CSFの投与期間が大きく異なる．したがってG-CSFをPBSC動員の目的のみで投与するのは非効率的である．例えば，繰り返した化学療法の結果として骨髄疲弊状態になった患者では，化学療法後の造血回復が緩慢なので2週間以上G-CSFを投与しながらPBSC採取のタイミングを待っていることがある．このような場合にはG-CSFの総投与量は多くなり経済的効率は悪く，かつ採取できるPBSC量も少ない場合が多い．また，白血球数減少が軽度の化学療法後では，G-CSF投与開始時期や採取のタイミングが決定しづらいこともある．血中のCD 34陽性細胞数を測定しながら採取時期を決定できるような特殊な施設を除いては，もっと実用的な方法が求められて当然である．また，非侵襲的処置といえども患者の負担を考えると，PBSC採取は化学療法2コース程度に抑えたいものである．

自験例の検討で，化学療法後の骨髄回復期の血中

NII-Electronic Library Service

Japanese Society for Apheresis

表1　固形腫瘍患者における PBSC 動員効率（前治療歴のある小児患者）

	治療月数	AP処理量 (L)	採取量 MNC (×10⁸/kg)	採取量 CD 34 (×10⁶/kg)	採取量 CFU-GM (×10⁵/kg)	G-CSF(μg/kg)あたりの採取量 MNC (×10⁸/kg)	G-CSF(μg/kg)あたりの採取量 CD 34 (×10⁶/kg)	G-CSF(μg/kg)あたりの採取量 CFU GM (×10⁵/kg)
G CSF＋化学療法	2.5	7.8	4.8	12.1	8.4	0.1	0.19	0.22
(n=10)	(1～8)	(4～22)	(1.0～17)	(1.6～106)	(1.1～102)	(0.05～0.67)	(0.04～1.33)	(0.06～1.28)
G CSF 単独	8	16	9.9	6.0	15	0.2	0.12	0.32
(n=13)	(2～22)	(4.9～27)	(5.1～37)	(1.9～89)	(2.4～113)	(0.11～0.6)	(0.04～1.15)	(0.05～1.81)

数値は中央値(範囲)で示した．

G-CSF 濃度は高く，末梢血中の白血球数の回復とともに急速に低下することが判明している．つまり，白血球数が 1,000/μl に達するころには内因性 G-CSF の分泌は急速に減少するために，PBSC 動員目的ではこの時期から外因性 G-CSF を投与する価値が高いと考えている．

2.3　G-CSF 単独による PBSC 動員

上記のごとく，化学療法単独動員では骨髄回復期の PBSC のピークが非常に短期間であり，採取のタイミングをずらせるとほとんど採取できなかった．G-CSF を投与して血中濃度を高値に保つと，PBSC がより多く動員され，かつそのピークが維持されるため，G-CSF 併用の利点は PBSC のピーク値の維持にあるといってよい．この事実は，G-CSF を健常人ドナーに投与することで PBSC 動員採取が可能になることを予測させ，現実に同種 PBSCT が行われるようになった[8,9]．種々の検討結果により，最近では 5 日間連続で 10 μg/kg/日の G-CSF が投与され，4～6 日目にアフェレシスを実施するようになっている．われわれはこれを患者に応用し，もっとアフェレシスの日程を計画的に設定できないかと考え，患者で G-CSF 単独動員を行いその効率を検討した．その結果，すでに化学療法を施行している患者でも条件を整えれば十分に G-CSF 単独動員で PBSCT に必要な細胞数を採取できることを確認した．表 1 は小児固形腫瘍患者で，化学療法＋G-CSF で PBSC 動員を行っていた時期の採取量と，最近の G-CSF 単独動員による採取量を比較したものである．単独動員の施行患者の平均治療歴が 8 か月と，化学療法＋G-CSF の 2.5 か月に対して有意に長期間であるにもかかわらず，1 回のアフェレシスの処理量を多くすることで，単位 G-CSF あたりの採取 PBSC 量はほぼ同等である．この方法であれば，化学療法後に G-SCF を併用投与する方法に比較して，アフェレシスの日を計画的に決められる点で非常に有用である．

3.　アフェレシスによる PBSC 採取

特殊な細胞処理施設を有しない臨床病院において，アフェレシスで PBSC を採取・凍結保存することは大変な労力であった．しかし，造血幹細胞救済療法として PBSCT の有用性が認められるにつれて，連続血液成分分離装置は一般病院にも普及して使用されている．また一部の地方では赤十字血液センターの協力によりアフェレシスをセンターに委託できる場合もある．現在国内で入手可能な採取のための機種にはそれぞれの特徴があるが，機種による採取効率の明確な差は認められていない．もし採取量に差が出るとすれば，患者自身の PBSC 動員効率の差と血液のヘマトクリット，高脂血症などの方がより大きな影響を与えていると思われる．

安全かつ効率的なアフェレシス施行のポイントは，血液透析や通常の献血などと同様にいかによい血管を確保し，血流を保つかという点にある．機種によっても若干異なる点はあると思われるが，一定の流量で採取と返血が行われることにより効率的な PBSC 採取ができるように設計されている．多くは 50～70 ml/分が至適採血スピードと考えられるが，小児患者では 50 ml/分の血流を確保することはなかなか難しく，30～50 ml/分を目標に処理している．そのために徳島大学小児科では橈骨動脈に 20～22 G サーフロー針を留置して採血し，肘静脈に返血する方法をとってきた．これにより，体重 6～7 kg の乳児からでも安全かつ効率的に PBSC 採取を行っている[10]．

小児患者においてもう一つ大切なことは，アフェレシス施行時の対外循環量である．現在われわれが使用しているバクスター社の CS 3000 plus は，small volume collection chamber (SVCC) と small volume separation chamber holder (SVSCH) の組み合わせで使用すると，体外循環量を 190 ml 程度に抑えられる．通常のチェンバーでは 400 ml であることを考えると少ないが，それでも 20 kg 以下の小児にとって

NII-Electronic Library Service

Japanese Society for Apheresis

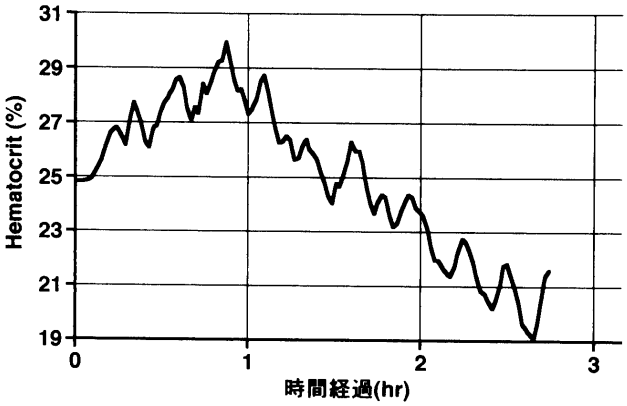

図3　アフェレシス施行中の患者末梢血ヘマトクリット値の変動

クリットラインモニター（JMS社）を用いて14 kgの神経芽腫症例における変動を示した．プライミングに1単位の同種血を使用しているが，処理中にヘマトクリットは19%まで低下した．

は大きな負担であり，プライミングに自己または同種血を使用せざるをえない．図3は体重14 kgの小児が，上記の小児用チェンバーを用いてアフェレシスを行ったときに，持続的に血中のヘマトクリット値を測定したものである．プライミングに血液1単位を用いると，初めは輸血効果のためにヘマトクリット値が25%から30%まで増加するが，その後終了間際には19%まで低下した．PBSCTを計画する患者の場合は通常貧血があるので，自覚症状はほとんど認めないが，プライミングに赤血球を使用しても，基本的にアフェレシス開始前のヘモグロビン，ヘマトクリット値は平常より高めにしておくことが望ましい．このように乳幼児ではアフェレシス施行中の心拍数や呼吸状態にも注意が必要である．

次に，抗凝固剤として使用されるACDに含まれるクエン酸は，急速な静脈内投与で低カルシウム血症を合併することがあり注意を要する．特に小児の場合は，体重に比較して処理血液量が多いうえに採血速度が早いこと，さらに症状の訴えが少なく突然の嘔吐や不機嫌で発症するので，予防的にカルシウム製剤を投与することも必要である．われわれは血液200 ml処理に対して1 mlのグルコン酸カルシウムを持続的に投与している．ほとんどの症例では，この処理により問題がないが，一部に感受性の高い症例があり，頻回の追加投与が必要になることがある．

4. 細胞保存処理

採取された細胞の処理は各施設で試行錯誤の結果，それぞれの実用的な方法で行っている．バッグで保存するのが良いとか，あるいはチューブで保存した方が良いとかの議論は必要ないであろう．もっとも手間がかかる凍結保存方法についても，プログラムドフリーザーを用いない方法で実用に耐えうることが多くの研究によって確認されている[11,12]．またアルブミンを加えるだけの凍害防止液も市販されており，一般病院で使用することも可能であり現実的な問題点はないように思われる．ただし，今後PBSCを標的とした遺伝子治療の発達などで，細胞の純化処理が必要になった場合に，現在と同じ方法でよいのかどうか確認することが必要になる．また，Katayamaらが報告しているように[13]，いわゆる簡易法の凍結保存手技では，融解後の回収率が約70%程度であるため，臍帯血細胞のように数年以上の長期保存を目的とする場合，現在PBSCの保存に用いられている方法でよいのかどうか検討する必要はある．

5. 今後の展開

自家PBSC採取について現状を記述したが，実際には各施設でそれぞれの工夫が加えられて臨床応用されているものと思われる．患者から効率的な採取を計画的に行うことが重要で，そのためには採取あるいはその後の細胞純化も含めて対象疾患・患者の選定が肝要である．本稿で示した動員・採取方法は今後小児も含めた癌患者以外の治療にも応用可能である．アフェレシスによる採取について，今後改良が必要であるとすれば，癌であれば何でもPBSCT併用大量療法というのではなく，PBSC分画中の必要な細胞群（例えばCD 34陽性細胞）を純化し，それを標的に種々の遺伝子操作を加えたり，数回にわけた幹細胞救済療法を計画したり，個々の癌腫に応じたPBSCの利用方法が確立されていくものと考えている．

文　献

1) Gratwohl A, Hermans J, Baldomero H for EBMT: Blood and marrow transplantation activity in Europe 1995. Bone Marrow Transplant **19**: 407-419, 1997
2) To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA: The biology and clinical use of blood stem cells. Blood **89**: 2233-2258, 1997
3) Hildebrandt M, Mapara MY, Korner IJ, et al: Reverse transcriptase-polymerase chain reaction-controlled immunomagnetic purging of breast cancer cells using the magnetic cell separation (MACS) system: a sensitive method for monitoring purging efficiency. Exp Hematol **25**: 57-65, 1997
4) Roberts WM, Estrov Z, Ouspenskaia MV, et al: Mea-

NII-Electronic Library Service

Japanese Society for Apheresis

surement of residual leukemia during emission in childhood acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med **336**: 317–323, 1997
5) To LB, Shepperd KM, Haylock DN, et al: Single high dose of cyclophosphamide enable the collection of high numbers of hemopoietic stem cell from the peripheral blood. Exp Hematol **18**: 442–447, 1990
6) Takaue Y, Watanabe T, Abe T, et al: Experience with peripheral blood stem cell collection for autografts in children with active cancer. Bone Marrow Transplant **10**: 241–248, 1992
7) Kawano Y, Takaue Y, Watanabe T, et al: Effects of progenitor cell dose and preleukapheresis use of human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the recovery of hematopoiesis after blood stem cell autografting in children. Exp Hematol **21**: 103–108, 1993
8) Diaz MA, Alegre A, Villa M, et al: Allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation in children with haematological malignancies. Br J Haematol **96**: 161–164, 1997
9) Frickhofen N, Korbling M, Fliedner TM: Is blood a better source of allogeneic hematopoietic stem cells for use after radiation accident? Bone Marrow Transplant **17**: 197–199, 1996
10) Takaue Y, Kawano Y, Abe T, et al: Collection and transplantation of peripheral blood stem cells in very small children weighing 20kg or less. Blood **86**: 372–380, 1995
11) Takaue Y, Abe T, Kawano Y, et al: Comparative analysis of engraftment after cryopreservation of peripheral blood stem cell autografts by controlled- versus uncontrolled-rate methods. Bone Marrow Transplant **13**: 801–804, 1994
12) Valeri CR, Pivacek LE: Effects of the temperature, the duration of frozen storage, and the freezing container on *in vitro* measurements in human peripheral blood mononuclear cells. Transfusion **36**: 303–308, 1996
13) Katayama Y, Yano T, Bessho A, et al: The effects of a simplified method for cryopreservation and thawing procedures on peripheral blood stem cells. Bone Marrow Transplant **19**: 283–287, 1997

NII-Electronic Library Service