

末梢血幹細胞採取

井 福 武 志

医療法人雪の聖母会 聖マリア病院 臨床工学室

1. は じ め に

末梢血幹細胞移植(PBSCT:Peripheral Blood Stem Cell Transplantation)は、造血幹細胞移植の一つであり、他に骨髓移植(BMT: Bone Marrow Transplantation)、臍帯血幹細胞移植(CBSCT:Cord BSCT)がある。それぞれに特徴を有するため、最適な移植法が選択され実施されている。PBSCTにおいては現在、自家および同種移植が施行されている。

2. PBSCTの概要

PBSCTは、化学療法に有意な感受性を有する各種悪性疾患において、大量化学療法を安全に施行する方法として導入されてきた。平成6年4月より、自家PBSCT(Autologous PBSCT)は、保健診療として認可され急速に普及し、平成12年4月からは、同種PBSCT(Allogenic PBSCT)も認可され実施されている。

自家PBSCTは、末梢血中に僅かな造血細胞の存在が以前より知られており、骨髓抑制を来すような強力な化学療法後の回復期に、造血性サイトカインである顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF:granulocyte-colony stimulating factor)を併用することで、一時的に末梢血中に数十倍にも動員される事を利用し、それを採取し、骨髓の再構築に利用する治療法として実施されてきた。

自家BMTに比べ、長所としては、

- 1)全身麻酔が不必要である。
- 2)移植後の末梢血液所見回復が早いため白血球減

少に伴う感染症の併発も少ない。

3)癌の骨浸潤がある、全身麻酔が禁忌、腸骨領域に放射線を照射したなどの理由で骨髓採取の困難な症例にも適応できる。

4)同種BMTより適応年齢の幅が広い。

5)HLA(human leukocyte antigen)適合ドナーを必要としない。

6)移植片対宿主拒絶反応(GVHD: graft-versus-host disease)。

を併発しないことなどである。

短所としては、

1)数回の採取が必要である。

2)GVL(graft-versus leukemia)効果が期待できない。

3)造血器腫瘍では末梢血幹細胞(PBSC:Peripheral Blood Stem Cell)は骨髓に比べ、腫瘍細胞の混入が少ないと報告がなされているが、混入を否定できないなどである。

同種PBSCTについては、G-CSFを単独投与する事で、末梢血幹細胞が1~3回のアフェリシスで移植に十分な採取ができることが報告され、実施されている¹⁾。長所としては、

1)全身麻酔が不必要。

2)移植後の造血回復が早い。

3)GVL効果が期待できる。

4)同種BMTに比しドナーへの負担が少ない。

などで、今後、非血縁者間の移植にも応用される可能性を有している。

短所としては、

1)慢性GVHDの発生頻度が多い。

2)ドナーへのG-CSF投与による安全性が確立していない。

短期的副作用として、

3)骨痛、発熱や血小板の二次凝集の促進や血小板減少など。

4)G-CSF投与による脾臓破裂。

キーワード : PBSCT, G-CSF, GVL 効果, VVR, mobilization 採取時期, スキャッタグラム, 副作用, 分離装置

5)アフェレシスによる重症な血管迷走神経反射(VVR:vasovagal reflex)がある。

長期的副作用として、

6)G-CSFが、造血能に及ぼす影響が未だ明確に判明していない。
ことである²⁾。

3. PBSCT の適応疾患

PBSCTの適応疾患は、自家BMTと基本的に同じである。

血液疾患においては、非Hodgkinリンパ腫(NHL)・Hodgkin病難治例・急性リンパ性白血病(ALL)・急性骨髄性白血病(AML)・多発性骨髄腫(MM)などである。

固形腫瘍においては、乳癌・卵巣癌・睾丸腫瘍・胚細胞種・肺小細胞癌・神経芽細胞腫・横紋筋肉腫などが適応となる³⁾。

4. PBSCT のフローチャート

PBSCT のフローチャートは、
・骨髄から末梢血中へ造血幹細胞を動員(mobilization)



・血液成分分離装置を用いPBSC採取



・凍結保存(凍結保存の不必要な場合もある。)



・採取液の一部を造血幹細胞の評価として、造血幹細胞の表面マーカーであるCD34(cluster differentiation 34)陽性細胞数や顆粒球・マクロファージ前駆細胞(CFU-GM :colony forming unit- granulocyte / macrophage)数の測定



・大量化学療法の24-48時間後、保存しておいたPBSCを輸注で行われる。

5. PBSCT の動員(Mobilization)方法

骨髄から末梢血中にPBSCを動員する方法としては、

1)化学療法後の造血回復期に採取する方法:これは化学療法単独法で、幹細胞動員に乏しく、移植に十分な幹細胞数を採取するには数回のアフェレシスを要するため、現在は殆ど行われていない。

2)化学療法後の造血回復期にサイトカインを併用して採取する方法:現在この方法による動員法が主流となっている。しかし、強力な化学療法が短期間に繰り返される患者では、化学療法開始から約6ヶ月以内に採取を実施することが望ましい。これは、幹細胞の末梢への動員が困難となるためである。また、化学療法のレジメンには、PBSC採取のみを目的としたものと抗腫瘍効果をも目的に加えたものとに分けられる¹⁾。何れにせよ、PBSC数は患者の骨髄予備能に大きく左右される。

3)サイトカイン単独投与による動員後採取する方法:主に血縁者間の同種PBSCTに用いられる。サイトカインとしては、G-CSF、GM-CSF(granulocyte/ macrophage - CSF)、IL-3 (interleukin-3)、SCF(stem cell factor)などがあるが、現在、本邦で保険適応とされているのはG-CSFのみであり、他のサイトカインに比して、副作用が少ない。

6. PBSC 採取時期

PBSC採取時期の決定は、採取当日の末梢血中の造血幹細胞数を知ることが確実であるが、コロニーアッセイ(Colony Assay)法によるCFU-GM数は、結果が判るまで2週間程の時間を要するため、PBSC採取時期の早期決定に用いる事ができない。このため当初より、自動血球計数器で簡便に得られる白血球数、血小板数、単球数などや網赤血球が指標とされてきた。しかし、現在では、CD34陽性細胞中に造血幹細胞が多く含まれるという知見に基づき、また、CFU-GM数とよく相関することから⁴⁾、採取当日の末梢血中のCD34を測定することで、採取すべきか否かを知る事が可能となった。しかしながら、CD34の測定には、ファックススキャン(FACS)等のフローサイトメーター、及びモノクローナル抗体が必要で設備やランニングコストの面からも、全ての施設において可能であるとは考えられない。そこで、我々が当初より利用してきた、自動血球計数装置で血算値と同時に得られる、粒度分布表や幼若球の情報(未成熟細胞と

成熟細胞の分別)を示すIMI(Immature Information)と白血球内のリンパ球, 単球, 顆粒球を示すDIFFのスクエッタグラムなどで代用している施設もあるが, これには, 経験的判断を要する⁹⁾. 一般的な採取時期としては, nadir後, 末梢血中の白血球が増加し始めた頃より, 連日G-CSFを(5-12 μ L/Kg/day)投与し, 白血球数5000~10000/ μ L以上, 血小板数5万/ μ L以上の時点より採取を開始し, 1~3回採取する. これは, G-CSF投与後4~6日にあたる.

G-CSF非投与例では, 白血球数1000/ μ L以上, 血小板数5万/ μ L以上で採取を連日または隔日に1~3回採取を行う. また, 採取当日の末梢血中のCD34陽性細胞数が50/ μ L以上出現すれば, 移植に必要な幹細胞が採取可能であると報告されている⁹⁾.

7. 血液成分分離装置の特徴

末梢血液中の造血幹細胞を採取するには, 遠心型血液成分分離装置を用いて行う. 現在, わが国で用いられている主な機種として, HAEMONETICS社製Multi, Fenwall社製CS3000Plus, GAMBRO BCT社製Spectra, Fresenius社製AS.TEC204があり, 簡単に比較してみた(表1)⁷⁾.

Multi(写真1)は, 同社V-50を改良した後継機であり, 現在, 新機種ccsにもPBSC採取モード導入を検討中である. 他の遠心型成分分離装置と比較して, 小型軽量で振動や騒音も小さいため, 移動が容易で, ベッドサイドなど, 採取場所を選ばない. 本体価格, 回路価格が他機種と比し低価格である. 間欠血流方式である為, 穿刺による患者への負担を軽減する事ができる反面, 連続式と比較すると同量処理するには長時間を要する. しかし, 独自のラインセンサーで少処理量でも単核球

の高回収率が可能である. また, モニターポーチコントロールシステムは, 採血流量・返血流量を自動制御している. 他機種のプライミング時間が10分程かかるのに比べて1分と短い. 体外循環血液量は, ドナーのHt値に左右され, 使用するボウル容量により, 125~225と350~600mLとなる. 小児等には不向きである.

CS3000plus(写真2)は, 同社CS300の後継機である. 連続方式で全自動, 採取バッグを遠心しながら,

幹細胞採取を行う. 採取バッグが本体内部にある為, 採取バッグを見ながらの調整や, 途中で採取液のサンプリングは簡単ではない. 採取量はSVCC(スモール ボリューム コレクション チャンバー)を用いると, 50mL程になり, 採取液中の血小板の混入減少と後処理の短縮が可能となる⁸⁾. 他の機種にない, 34℃程度の保温機能を有し, 血液の体外循環による温度低下を補助できる. 短所としては, 抗凝固比率はラインの張力で設定するため曖昧, 重量が315kgあり移動には適さず, 騒音・振動も大きい. しかし, 現在, 成分採取機種として登場した同社, アミカス(写真5)は, CS3000Plusの短所を取り除き, PBSC採取モードも導入された. 軽量, 回路装着が容易, 12個の圧力センサー装備等が付加されており, 採取効率アップのため, 改良の検討中である.

Spectra(写真3)は, 連続血流方式の成分分離装置である. 他機器同様, 全自動ではあるが, 手動操作も可能で, オペレーターがインターフェイスをプラズマポンプ流量で調節しながら採取を行う. 専任のオペレーターが確保できれば, マニュアル操作で, 効率よい採取が期待できる. 自動モードでは, Ver4.0からHt値を入力するだけで自動調整する事も可能となり, 現在のバージョンでは, AUTO PBSC回路を使用する事で, 体外循環量が165mL, 採取量は30mLとなる. 濃縮工程は無く, 連続的に採取するため, 脱血

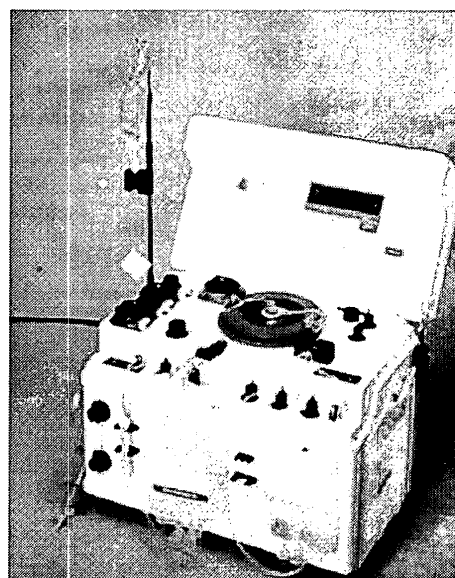


写真1 Multi

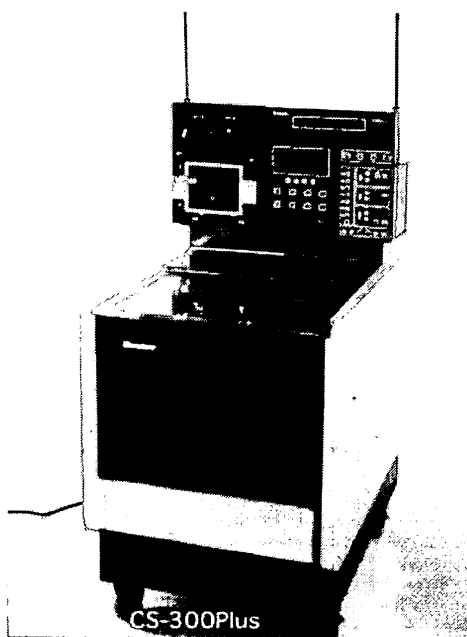


写真2 CS-300Plus

機種名	Multi	AS104	CS-3000plus	Spectra
製造会社	HAEMONETICS(米)	Fresenius(独)	Fenwall(米)	COBE(米)
販売会社	ヘネティクスジャパン	アムコ	バクスター	ユフ・テック・リリス
重量(kg)	28	145	315	175
振動 騒音	小	中	大	中
本体価格	7,500,000	15,200,000	15,300,000	15,500,000
回路価格	22,000	35,000	35,000	32,760
機能	成分採取 血小板採取 骨髓濃縮	成分採取 血小板採取 骨髓濃縮 血漿交換	成分採取 血小板採取 骨髓濃縮 血漿交換	成分採取 血小板採取 骨髓濃縮 血漿交換
制御方式	全自動	全自動	全自動	全自動・手動
採取方式	間欠式	連続式	連続式	連続式
ブラッド アクセス	片腕法	両腕法	両腕法	両腕法
体外循環 血液量(ml)	400~600	180	190	285
採取バック 位置	本体外	本体外	本体内	本体外
保温機能	なし	なし	34℃	なし
抗凝固比率	1:8~16	1:6~18	1:7~13	1:2~50
プライミング時間	1分	6分	9分	10分
採取量(ml)	100~150	180~300	50 or 200	100~500
採取液Ht値	5~10%	2~5%	10~20%	1~10%
採取時間 150ml/kg	5~6h	3~4h	3~4h	2~3h
移動性	容易 (ベッドサイド可)	可 (車輪・中)	可 (難)	可 (車輪・大)
技術力	要	要	要	重要
備考	ラインセンサー(濃・採) 少処理→高回収 モニター・コントロール システム(脱・返血)	オフティカルモニター スイッチがなし プリンター装備	バック内濃縮 SVCC	インターフェイスを 目視 マニュアル操作→可 オペレーターの技術力 Ht値入力

表1 遠心型血液成分分離装置の比較

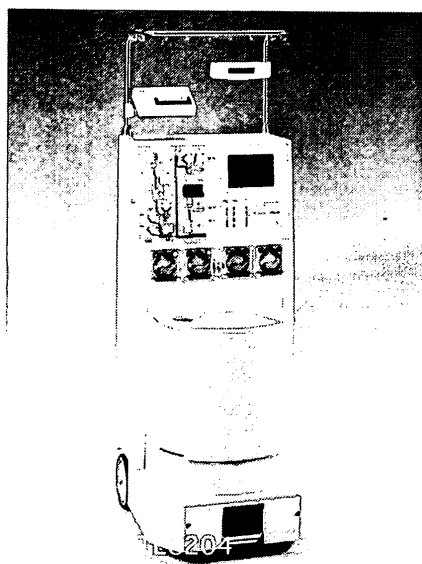


写真4 AS.TEC204

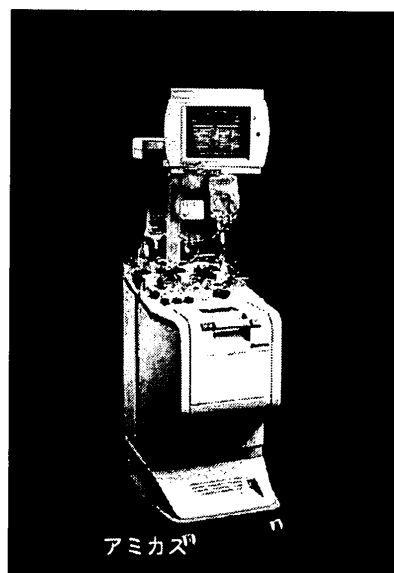


写真5 アミカス



写真3 Spectra

不良等が採取効率を左右する要因になるが、同処理量に要する時間は、最も短くてすむ。車輪も大きく、移動は容易である。抗凝固比率が1:2~50と広く設定できるため、ACD-A液使用によるクエン酸中毒に対処し易い。

AS.TEC204(写真4)は、AS104の後継機種にあたる。連続方式で、インターフェイスモニターによりバフィコートを検出し採取する全自動タイプある。採取行程は、白血球濃縮工程後、2次ステージにバフィコートを溜め、採取バッグに送り出す工程を有するため、半間欠式といえる。特徴としては、体外循環血液量が170ccと少ない、

Spectra同様、採取バッグが本体外にある為、採取中に採取液を見て条件設定の変更が可能であり、採取液をサンプリングする事もできる。また、プリンターが標準装備され、採取行程の操作全てをデータとしてプリントアウトできる。また、CS3000plus同様、オリジナルの採取プログラムを登録することができ、他機器の特徴を合わせ持った中間的存在と言える。

採取機器は、各々に特徴を有するため、これら機器の特徴、分離性能、取扱い方を踏まえ、使用する施設の採取スペースやスタッフの状況、ランニングコスト等を考慮した上で、より安全に効率よく採取する事が望ましい。機種を選択が採取細胞数を左右するようなことは無いといえる⁷⁾。

8. PBSC 採取の実際

PBSC採取は、出来るだけ患者の負担を軽減する事(アフレスシスの回数、総血液処理量、処理時間)を念頭に入れ、移植を安全に行うための造血細胞数を効率よく採取する必要がある。

8.1 PBSC 採取の流れ

血液成分分離装置に回路をセットし生理食塩液にてプライミング→ブラッドアクセスの確保→採取の開始→バフィコートの採取→返血作業の順で行われる。

8.2 ブラッドアクセス

成人の場合、脱血流速を50~70mL/minで行うため、脱血部位は、18 G以上の太めの留置針等で安定した流量確保が望まれる。これは、膜分離における脱血不良の問題点とは違い、凝血を気にしなくて良いが、処理時間の遅延や、使用機種によっては採取効率に影響を及ぼしてしまう。返血側は、返血圧が高

くなりすぎないように注意を払い、20 G以上の留置針等で四肢に確保すれば良い。経験上では、脱血は、鼠径部静脈にシングルルーメンカテーテルか、側孔付きの留置針(固定は要注意)で確保し、返血は、四肢の皮静脈に確保するのが良いと思われる。両腕を用いるのは、総処理時間等を考慮すると、拘束による筋緊張による頭痛、肩凝りなどに陥りやすく、脱血流量が安定しないなどで好ましくない。また、ダブルルーメンカテーテルの使用は、返血孔から脱血孔への短絡血流(ショートサイクル)を生じ効率低下に繋がる。しかし、血管確保の困難なケースは多々あり、その際はこの限りではない。

小児の場合、拘束性に注意を払い、脱血を橈骨動脈、返血に正中静脈を使用するのが好ましいと思われる⁹⁾。また、採取に用いる血液成分分離装置のプライミングボリュームが多いため、事前に血液製剤などを補充し、プライミングを行う必要もある。

8.3 採取方法

総処理血液量は、150~200mL/kg患者(ドナー)体重を目標に行うと、約8~12Lとなり、採取に要する時間は、大体2~4時間となる。経験上、採取液中の単核球は、処理血液量120mL/kg前後までは減少していき、その後、再上昇する傾向があった。これは、採取開始からの処理時間に依存しているとも考えており、開始後、約90~120分に当たる。何れにせよ、末梢中の白血球減少による骨髓からの動員と考えられる。

抗凝固薬は、基本的にはACD-A液を使用し、AC比は1:13~18程度で行う。注意点として、AC比が高率であれば、クエン酸中毒を招きやすく、低率であれば、凝血を招きやすくなる。

8.4 採取目標の細胞数

施設により若干の違いはあるが、患者体重あたり、CD34陽性細胞数では、 $1\sim2\times10^6/\text{kg}$ 以上、CFU-GM数では、 $1\sim5\times10^5/\text{kg}$ 以上とする。

8.5 採取時の注意点(副作用)

クエン酸中毒は、ACD-A液による低Ca血症であり、PBSC採取においては軽微ではあるが、比較的よく見られる副作用である。初期症状は、口唇や四肢にしびれを出現し、その後、不快感、悪心、嘔吐を呈する。この場合の対処法は、症状発現時にイオン化Caの注入を行い、脱血速度を下げる。また事前に、返血側からイオン化Caの持続注入(生理食塩液で2倍希釈液を5~10mL/hr)を行う。経験上、ACD-A液流

量が、総血液量の千分の1以下ならば、低Ca血症を起した症例はなかった。また、総循環血液量が少ない症例に出現しやすく、特に女性に出現しやすい傾向がある。VVRは、患者(ドナー)の心理的不安や緊張が、発生原因とであり、気分不良、顔面蒼白、欠伸、悪心、嘔吐などの症状に血圧低下を伴う。過去には、VVRによる死亡例の報告もある。対策としては、採取前に患者(ドナー)に十分な説明を行い、採取中はスタッフがコミュニケーションを図ったり、ビデオ鑑賞などでリラックスさせることが肝要であると思われる。症状発生時には、落ち着くまで採取を中断し、リラックスさせる事が必要である。

血小板減少は、PBSC採取のためのアフエリシス回数が多くなるほど、減少していく。このため、採取前の血小板数は必ず確認する必要がある。採取機種にもよるが、1回のアフエリシスで約30～40%血小板が減少する傾向にあるため、効率よい造血細胞採取で、アフエリシス回数を出来るだけ少なくすることが望まれる。

寒さの訴えについては、血液の体外循環時間に依存する。使用装置や気候、季節にも依るが、大抵、電気毛布や加温器を使用することで対処できる。

以上、注意点として幾つかがあげられるが、過去1000回以上のPBSC採取を実施した経験上では、開始直後VVRで、アフエリシス中断をした数例、また、採取中盤以降に、クエン酸中毒による採取中断を数例経験した。PBSC採取を中止した例は、重症VVRによる例とカテーテル入れ替え時によるものと思われる肺梗塞を呈した例の2例があった。

9. ま と め

本法に於いて末梢血中の造血幹細胞を効率良く採取するには、疾患別に採取前の化学療法レジメンやサイトカインの投与による動員方法が採取効率に大きく影響し、ひいては治療の成否に左右すると

いっても過言ではないと思われる。

PBSC採取時における注意点のまとめとして、

- ・採取時間、採取回数を少なくを念頭に、採取時期を外さず、効率よく採取する。
 - ・採取前に患者(ドナー)の背景や状況を把握した上で、採取時に起こりうる状況について、十分な説明を行い、リラックスさせることを心がける。
- などが大切である。

また、別視点からPBSC採取による負担を軽減するためには、PBSCのex.vivo増殖、CD34陽性細胞の純化など、研究応用の早期導入が待たれる。

文 献

- 1)高橋恒夫,関口定美:同種末梢血幹細胞移植の可能性,日常診療と血液 Vol.5 No.5,645-649,1995
- 2)森下剛久,堀部敬三,森島泰雄:同種末梢血幹細胞移植,造血幹細胞移植マニュアル 日本医学館 358-360
- 3)原田実根:末梢血幹細胞移植の概要,末梢血幹細胞移植 南江堂,1995,1-4
- 4)関口定美,池淵研二:末梢血幹細胞採取,“アフエリシスマニュアル”秀潤社,1999,105-110
- 5) T,Ifuku,Y,Imamura,K,Egami: Timing of Peripheral Blood Stem Cell Harvest “Therapeutic Plasmapheresis(xiv)” Jpn J Apheresis Vol 14 No1 1995,28-29
- 6)島崎千尋:末梢血幹細胞の動員と採取,末梢血幹細胞移植,南江堂,1995,20-23
- 7)井福武志:末梢血幹細胞採取における機器の選定,医工学治療 Vol.8 1996 121-123
- 8)巽 典之:末梢血幹細胞の採取と機器,日常診療と血液, Vol.5 No.2,177-180,1995
- 9)河野嘉文:末梢血幹細胞の動員および採取(小児),“末梢血幹細胞移植”,南江堂,1995,41-44