

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) や臍帯血幹細胞移植 (CBSCT: Cord Blood Stem Cell Transplantation) がある。各々に特徴を有するため、最適な移植法が選択され施行されている。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、化学療法に対し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、末梢血中にも僅かな造血細胞の存在が以前より知られており、骨髓抑制を来する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 PBSCT は自家 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 system A) 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 造血器腫瘍においては PBSC (peripheral blood stem cell) は骨髓に比し腫瘍細胞の混入が少ないとの報告もあるが混入を否定できない。

同種 PBSCT 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 効果が期待できる可能性がある。

④ 同種 BMT に比しドナーへの負担が少ない。などで、今後、非血縁者間の移植への応用も検討。

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。

短期的な有害事象として、

③ 骨痛、発熱、血小板二次凝集の促進や血小板

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, 有害事象, 分離装置

減少など。

④ G-CSF 投与による脾臓破裂。

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。

長期的有害事象として、

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²⁾。

とされている。欧米のメタ解析によると早期の造血回復、無病生存、再発率の低下において PBSCT が優れていると報告されている³⁾が、現在本邦では BMT と PBSCT の前向き比較試験が行われている。

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⁴⁾。

また、ドナーから採取する場合は、原則としてドナーの年齢上限を 65 歳、下限を 10 歳としている⁵⁾が、小児の場合には PBSC 採取よりも全身麻酔下の骨髄採取が優先される。

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)



- ・ 遠心型血液成分分離装置を用いた PBSC 採取



- ・ 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



- ・ 凍結保存 (凍結保存の不必要な場合もある。)



- ・ 大量化学療法施行後、24-48 時間後に保存しておいた PBSC を輸注する。

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 6 ヶ月内程度に採取を実施することが望ましい。これは、末梢への幹細胞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、網赤血球等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⁶⁾、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、及びモノクロナー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 のスキャ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⁷⁾。

自家 PBSCT の一般的な採取時期としては、nadir 後の末梢血中白血球が増加し始めた頃より連日 G-CSF を (5-12 μ g/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。同種 PBSCT では、平均的に G-CSF (10 μ g/ドナー体重 Kg) 投与後 4 ~ 6 日目にピークがあると報告されている。G-CSF 投与法については、1 日 1 回投与と 1 日 2 回分割投与法があるが造血幹細胞の動員効率や有害事象について、両者の差異については一定のエビデンスがなく採取施設に一任される。G-CSF 投与後は連日にわたり白血球数測定が必要であり、白血球数が 50,000/ μ L 以上になった場合には G-CSF 投与量の減量を考慮し、75,000/ μ L 以上になったら G-CSF 投与を中止する⁸⁾。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。遠心分離法は連続血流方式と間歇血流方式に大別される。前者は回路内に連続的に脱血しながら遠心分離し採取と返血を同時に行う。後者は回路内に間歇的に一定量の脱血、遠心分離、採取、返血のサイクルを繰り返し行う方法である。また、連続血流方式は両腕法(ダブル・二針)であるためドナーや患者の拘束等による負担をしいるが、処理時間が短い等の利点を有する。一方、間歇血流方式は片腕法(シングル・単針)であるため負担は少ないが、処理時間が長く、体外循環量が連続方式に比し多く循環動態にも影響を及ぼす等の欠点がある。

現在、わが国で用いられている主な機種として、連続遠心分離方式では GAMBRO BCT 社製 Spectra, Fresenius 社製 AS.TEC204, COM.TEC, 間欠式遠心分離方式では HAEMONETICS 社製 CCS があり、3 社 5 機種があり、以下に簡潔に特徴を記す。

7-1. GAMBRO BCT 社 (COBESpectra 写真1)

両腕式の連続血流方式の成分分離装置である。他機器同様に全自動ではあるが、手動操作も可能である。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。濃縮工程は無く、連続的に採取するため、脱血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済む。専任のオペレーターが確保できれば、マニュアル操作で、効率よい採取も期待できる。Ver4.0 から Ht 値を入力するだけで採取が自動調整にて行われる。また、AUTO PBSC 回路を使用すると体外循環量が 165mL と少量で済む。抗凝固比率を細かく設定できるため、ACD - A 液使用によるクエン酸中毒に対処し易い。

7-2. Fresenius 社 (COM.TEC 写真2)

AS-TEC104, AS-TEC204 の後継機種であり、両腕式の連続血流方式である。インターフェイスモニターによりバフィーコートを検出し採取する全自動タイプである。現在、採取液量が約 200ml と濃縮した 100ml となる 3 タイプの回路があり用途にあわせて選べる。採取行程は、白血球濃縮工



写真1 COBESpectra

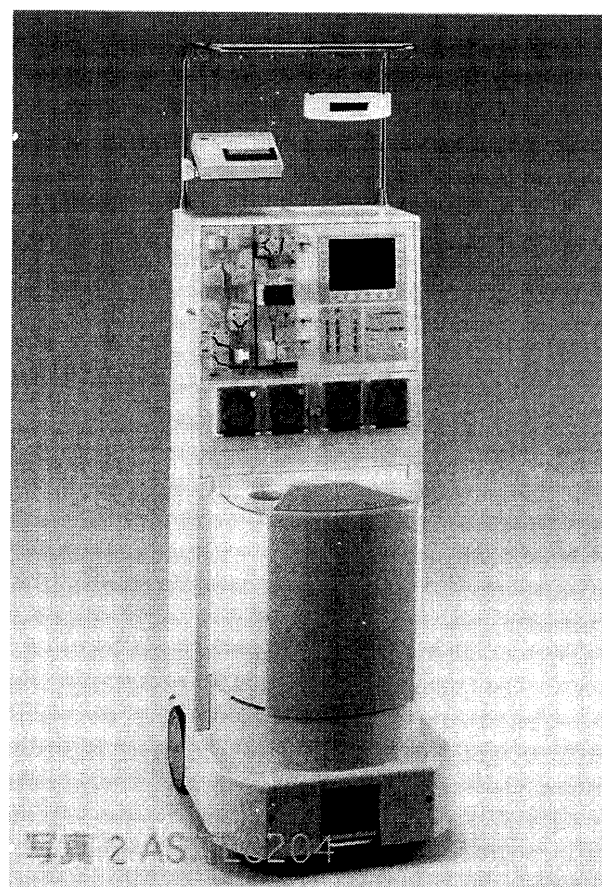


写真2 COM.TEC



写真3 CCS

程後、2 次ステージにバフィーコートをしめ、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 180cc 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の条件設定変更が可能であり、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。

7-3. HAEMONETICS 社 (CCS 写真3)

Multi の後継機種にあたり、本体価格、回路価格が他機種に比し低価格であり、小型軽量で振動や騒音も小さいため、移動が容易で、ベッドサイドでの採取も可能であり場所を選ばない。また、片腕（単針）式の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を処理するには長時間を要する。しかし、レーサムボウルといわれる釣鐘型のボウルが遠心器内で回転し流入した血液を分離し、独自のラインセンサーで少ない処理量でも単核球の高回収率が期待できる。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。

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。機種選択により採取細胞数が大きく左右するようなことは無いと言える¹⁰⁾。

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（アフェレシスの回数、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。

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（生食）にてプライミング後、バスキュラーアクセスを確保し、採取の開始となる。バフィーコート効率よく採取した後、返血作業となる。

2) バスキュラーアクセス

成人の場合の PBSC 採取では、脱血部位に四肢の静脈を第一選択とし、18 G 以上の太めの留置針にて脱血流速 50 ～ 70mL/min の安定した流量確保が望まれる。脱血不良による問題点として、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。返血部位は返血圧が高くなりすぎないように注意を払い、四肢の静脈に 20 G 以上の留置針を確保すれば良いと思われる。両腕法施行時の注意点としては、採取終了までの間、両腕を拘束されることによる筋緊張、肩凝りや頭痛に陥りやすく、脱血流量が安定しない場合がある。

自家 PBSC 採取患者では、四肢の血管確保が困難なケースが多々あり、ダブルルーメンカテーテル使用等を余儀なくされる場合もある。その際、返血孔から脱血孔への短絡血流（ショートサイクル）による採取効率低下を考慮した採取が望まれる。

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¹¹⁾。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、事前に血液製剤等を補充したプライミングを行う必要がある。

3) 採取方法

総処理血液量は、150 ～ 200 mL/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 時間と成る。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、採取開始から約 90 ～ 120 分後に再上昇する傾向がある。これは、末梢中の経時的な白血球減少による骨髓からの動員に要する時間と考えられる。

抗凝固薬は、基本的には ACD - A 液を使用し、AC 比は 1:12 ～ 16 程度で行う。同種採取時の AC 比は一般的に 1:12 から開始する。何れにせよ、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。

4) 採取目標の細胞数

施設により若干の違いはあるが、自家 PBSC では速やかな生着に必要な CD34 陽性細胞数を 1 ～ 2 × 10⁶/kg 以上、CFU-GM 数を 1 ～ 5 × 10⁵/kg 以上としている。

同種 PBSC では、移植片対宿主病の予防に methotrexate を使用することが多く、採取する CD34 陽性細胞数は、4 ～ 5 × 10⁶/kg とする施設が多い¹²⁾。

5) 採取時の注意点（副作用・有害事象）

クエン酸中毒は、抗血液凝固剤として用いる 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、比較的好く見られる有害事象である。構成成分であるクエン酸ナトリウムは、カルシウムとマグネシウムのキレート作用により抗凝固能を発揮する。回路内においては、停電等による血液ポンプの停止に際しても血液凝固が起こらないことや（アクセス部位は凝固防止対策を要する）、血液が体内に戻ると速やかに不活化されるため、体外循環中の血液凝固や患者の出血傾向に対しても安全に施行可能である。初期症状は、口唇や四肢にしびれが出現し、その後、不快感、悪心、嘔吐、さらには痙攣、意識喪失に至る場合もある。この場合の対処法としてはほとんどの場合、症状発現時に脱血速度を下げ、補液やカルシウム製剤の投与で予防可能である。また事前に、返血側からグルコン酸カルシウムの持続注入（生食で 2 倍希釈液を 5 ～ 10mL/hr）を行う。経験上、総 ACD - A 液使用量以上に比率や流速に影響されるため、総血液量の千分の 1 以下の ACD - A 液流速ならば、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、特に女性に出現し易い傾向がある。経過観察し症状の軽減が見られない場合はアフエレーシスを中止する。

血管迷走神経反射 (VVR : vaso-vagal reflex) は、患者 (ドナー) の心理的な不安や緊張に伴う神経生理学的反応である。アフエレーシス開始後の早い時間に発生することが多いが採取中にも発生する。症状としては、気分不良、顔面蒼白、めまい、欠伸、冷汗、悪心、嘔吐、さらには痙攣、意識喪失にまで至るケースもあり、同時に徐脈、血圧低下や呼吸数低下が見られる。過去には死亡例の報告もある。予防策としては、採取前に患者 (ドナー) に十分な説明を行い、採取中はビデオ鑑賞などでリラックスさせる等、不安や緊張の払拭や安心感の提供が肝要であると思われる。また、経時的に適切なモニタリングを行うことで初期症状の把握に努める。症状発生時には、採取、返血スピードを落とし、症状に応じて適切な処置をとることが必要である。

血小板減少は、PBSC 採取によるアフエレー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 回のアフエレーシスで約 30 ~ 40 % 血小板が減少する傾向にあるため、効率よい採取を行いアフエレーシス回数を出来るだけ少なくすることが望まれる。

血小板凝集については、ボウル方式では少ないが、連続血流方式で発生傾向にある。その対策として ACD - A 液の流量比率を高くすることで抑制できる。

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。

9. まとめ

本法において末梢血中の造血幹細胞を効率良く採取するには、採取前の疾患別化学療法のレジメン選択やサイトカイン投与による動員方法が採取効率に大きく影響する。これは、治療の成否に左右するといっても過言ではない。

PBSC 採取時における注意点のまとめとし

て、

- ・採取に要する時間や回数を少なする事を念頭に、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等が重要である。

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) Stem Cell Trialists' Collaborative Group JCO Aug 1 2005: 5074-5087.
- 4) 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
- 5) 日本造血細胞移植学会, 日本輸血学会 : 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・採取に関するガイドライン, 20030421 改訂第3版
- 6) 関口定美, 池淵研二 : 末梢血幹細胞採取, “アフエレーシスマニュアル” 秀潤社, 1999, 105-110
- 7) 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
- 8) 山根孝久, 青山泰孝, 日野雅之 : 骨髄・末梢血・臍帯血移植の実際, 臨床レビュー特集号 122 号, 125-133, 2002
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 池田和真, 原田実根 : 同種末梢血幹細胞採取におけるドナーアフエレーシスの安全管理, 日本アフエレーシス学会誌 Vol.21 No.3, 201-207, 2002