

原著論文

原発性 AL アミロイドーシスにおける末梢血幹細胞採取の安全性と効率の検討

千原伸也^{*1}・安井 寛^{*2}・升田好樹^{*3}・中野皓太^{*1}
 澤田理加^{*1}・室橋高男^{*1}・池田 博^{*2}・林 敏昭^{*2}
 石田禎夫^{*2}・巽 博臣^{*3}・今泉 均^{*3}

^{*1} 札幌医科大学附属病院臨床工学部, ^{*2} 同医学部内科学第一講座, ^{*3} 同救急・集中治療医学講座

Study of Safety and Efficiency of Peripheral Blood Stem Cell Harvest in Patients with Primary AL Amyloidosis

Shinya Chihara^{*1}, Hiroshi Yasui^{*2}, Yoshiki Masuda^{*3}, Kouta Nakano^{*1}, Rika Sawada^{*1}, Takao Murohashi^{*1}, Hiroshi Ikeda^{*2}, Toshiaki Hayashi^{*2}, Tadao Ishida^{*2}, Hiroomi Tatsumi^{*3} and Hitoshi Imaizumi^{*3}

^{*1} Division of Clinical Engineering, Sapporo Medical University Hospital, ^{*2} First Department of Internal Medicine and ^{*3} Department of Traumatology and Critical Care Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine

Summary Objective: This study was conducted to clarify the safety and the efficiency of peripheral blood stem cell harvest (PBSCH) for treatment of autologous peripheral blood stem cell transplantation (auto-PBSCT).

Patients and methods: Patients who received auto-PBSCT due to AL amyloidosis (AL group: $n=8$) and multiple myeloma (MM group: $n=6$) in the past five years were eligible for this study. Apheresis of mononuclear cells containing a CD34 positive fraction was performed using a cell separator via pretreated peripheral blood. For cell separation, blood flow was 50 mL/min and a 1/15 blood volume of ACD-A solution was used as an anticoagulant. Ten liters of blood was circulated for harvest. Monitoring of blood pressure was performed and yield rate of CD34-positive mononuclear cells was determined during PBSCH.

Results: Blood pressure at 30 min after starting PBSCH was significantly decreased in the AL group. The yield rate of CD34-positive cells in the AL group was significantly higher than that in the MM group.

Conclusions: Careful extracorporeal circulation is required in AL amyloidosis because potential hypotension can occur during PBSCH. Higher efficiency of CD34-positive cell harvest in AL amyloidosis can decrease the duration of extracorporeal circulation, resulting in reduction in PBSCH-related risk.

Key words: AL amyloidosis, stem cell, autologous peripheral blood stem cell transplantation, peripheral blood stem cell harvest, extracorporeal circulation

要旨 目的: 当施設での自己末梢血幹細胞移植に際しての末梢血幹細胞採取時の安全性と効率について検討した。

対象と方法: 過去5年間にALアミロイドーシス(AL群:8例)と多発性骨髄腫(MM群:6例)に対し自己末梢血幹細胞移植を行った患者を対象とした。方法は遠心式血液成分分離装置を用いて、血流量50 mL/min, その1/15の流量でACD-A液を投与し総量10Lとなるまで分離を行った。検討項目は、施行時の血圧と採取血液中のCD34陽性細胞数とした。

結果: AL群で開始30分に有意に血圧が低下した。採取血液中のCD34陽性細胞数はAL群ではMM群に比べ有意に高かった。

結語: ALアミロイドーシスは臓器障害の合併から末梢血幹細胞採取で血圧低下が生じる可能性があり、慎重な体外循環が要求される。ALアミロイドーシスでは幹細胞採取率が高く、体外循環時間を減らすことができ、より安全に治療にも反映できると考えられる。

2011年4月25日受付, 2011年6月27日受理.

1. 緒 言

原発性 Amyloid Light-chain (AL) アミロイドーシスは、形質細胞が異常産生する免疫グロブリン由来の線維性異常蛋白であるアミロイドが沈着し、進行性の臓器障害を引き起こす難治性疾患である。特に心不全合併例における平均生存期間は4か月と予後は極めて不良となる¹⁾。治療は一般的にステロイドなどによる薬物療法が中心となるが十分な治療成績をあげているとは言えない。そこで近年、AL アミロイド産生形質細胞を標的としたメルファラン大量静注と自家末梢血幹細胞移植 (autologous peripheral blood stem cell transplantation: auto-PBSCT) との併用による治療の有効性が報告され²⁻⁵⁾、AL アミロイドーシスの新たな治療法として期待されている。

一般に auto-PBSCT に際しての末梢血幹細胞採取 (peripheral blood stem cell harvest: PBSCH) 施行時には、体外循環による血圧の影響や抗凝固剤によるクエン酸中毒に留意し安全に行うことや、短期間に少量しか動員されない造血幹細胞を可及的に効率良く採取することが重要となる。特に、AL アミロイドーシスにおける PBSCH は様々な臓器障害を合併していることも多いため、安全性と効率を熟慮した体外循環の施行が望まれる⁶⁾。そこで今回われわれは、当院における auto-PBSCT 施行に際しての PBSCH における安全性と効率について AL アミロイドーシスと多発性骨髄腫 (multiple myeloma, MM) で後方視的に比較検討したので報告する。

2. 対象と方法

2.1 対 象

2006年10月から2010年3月までに当院にてALアミロイドーシスに対して前処置として化学療法後(体表面積あたり350mgのエトポシドを3日間)にPBSCHを施行した8症例(以下AL群)を対象とした。対照群として同時期にALアミロイドーシスと同じ形質細胞異常症を呈するMMに対して前処置としての化学療法後(体表面積あたり350mgのエトポシドを3日間もしくは体重あたり60mgのシクロフォスファミド2日間)にPBSCHを施行した6症例(以下MM群)とした。

2.2 auto-PBSCTの方法

auto-PBSCTは一般的に、前処置としての化学療法後に、①体表面積あたり300 μ gの顆粒球コロニー刺

激因子 (granulocyte-colony stimulating factor: G-CSF) を5日間連続皮下注射して造血幹細胞の動員、②PBSCHによる造血幹細胞の採取、③凍結保存、④移植という過程を経て施行される。本検討ではG-CSFによる刺激開始後、白血球数が10,000/ μ L以上に増加した時点でPBSCHを施行した。造血幹細胞はその表面にCD34を発現し、成熟とともにその発現が減少していく。そのため、遠心法により単核球分画を分離後に採取し、flowcytometryにてCD34陽性細胞数を計測した。PBSCHのために用いた使用機器や施行条件は以下とした。遠心式血液成分分離装置はCOM.TEC (フレゼニウス カービ ジャパン, 東京)、血液回路はC4Y (フレゼニウス カービ ジャパン, 東京) を用い、抗凝固剤としてACD-A液 (テルモ, 東京) を使用した。PBSCH施行条件は血流量50 mL/min, ACD-A液: 血流量の比率は1:15, 血液処理量10Lとし、クエン酸中毒予防のためグルコン酸カルシウムを血液回路から持続投与(425~595 mg/hr)した。ヴァスキュラーアクセスは右内頸静脈に血液浄化用ダブルルーメンカテーテル (DLC) のジェントルキャス[®] (日本シャーウッド, 東京) を留置し、DLC挿入直後から血栓による脱血不良予防のため携帯型ディスプレイ微量注入ポンプのシエラフューザーA[®] (ニプロ, 大阪) を用いてヘパリンを両ルートにそれぞれ15単位/hrで全身投与した。PBSCHの施行回数は体重1kgあたり 2×10^6 個以上のCD34陽性細胞が得られるまで行った。

2.3 検討項目

検討項目は、年齢、性別、体重、採取血のヘマトクリット、施行時の安全性の指標としてPBSCH施行前後の収縮期血圧、効率の指標として採取日末梢血における白血球数、単球数、リンパ球数、採取血液における白血球総数に対するCD34陽性率、体重あたりの採取血液CD34陽性細胞数とした。

2.4 統計方法

結果は平均 \pm 標準誤差 (Mean \pm SEM) で表した。2群間の比較にはStudent's *t*-test, Repeated two-way ANOVAを用い、群内の変化に関してはone-way repeated ANOVAを行った。*p*値が0.05以下で統計学的有意差があるものとした。

2.5 倫理面への配慮

対象となった患者には十分なインフォームドコンセントを行った上でauto-PBSCTおよびPBSCHを行った。データ解析は匿名にて行い、個人情報保護につ

とめた。

3. 結 果

3.1 対象患者の背景 (表 1)

年齢, 性別, 体重は両群間で有意差を認めなかった。

表 1 対象患者の背景

	AL 群	MM 群	p value
年齢 [歳]	51.4±3.3	56.5±3.2	N.S
性別 [男/女]	5/3	2/4	N.S
体重 [kg]	54.9±2.8	50.2±3.1	N.S
採取血液白血球数 [$10^3/\mu\text{L}$]	121±22	85±13	N.S
白血球濃縮率 [%]	660±157	930±403	N.S
採取血液 HCT [%]	3.1±0.5	3.9±1.0	N.S
平均施行回数 [回]	1.0±0	1.0±0.1	N.S

Mean±SEM.

また, 採取血液の白血球数, 白血球の濃縮率 (採取血液の白血球数/施行日の末梢血白血球数×100), ヘマトクリット値においても両群間に有意差はなかった。

AL 群の疾患背景を表 2 に示した。合併臓器障害は心臓, 消化管, 腎臓, 神経などであり, 障害臓器数は平均 2.3±0.2 であった。心機能の評価で用いられる脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) は 200 pg/mL を超える症例が 4 例であったが, 心エコーによる駆出率はいずれも 40% 以上保たれており, ボストン大学における PBSCT 適応基準⁷⁾を全症例満たしていた。腎機能においては生体組織検査によりアミロイドの沈着が 6 症例あったにもかかわらず, クレアチニンの軽度上昇の症例は 2 症例で, いずれも重篤な腎不全を合併した症例はなかった。

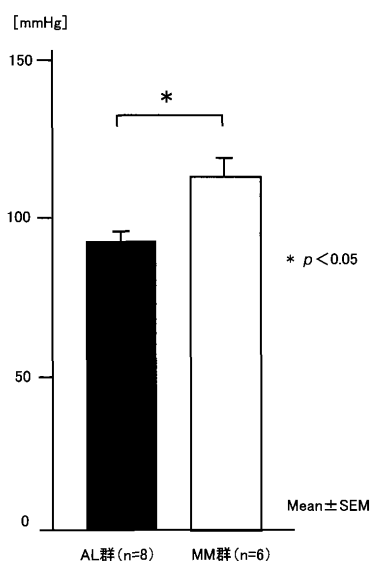
表 2 AL 群の疾患背景

年齢 (歳)/性別	化学療法の既往	障害臓器数 (障害臓器)	EF (%)	BNP (pg/mL)	クレアチニン (mg/dL)
1 52/男	なし	3 (心臓, 腎臓, 消化管)	66	243	1.0
2 55/男	なし	2 (心臓, 消化管)	50	336	1.2
3 47/女	なし	3 (心臓, 腎臓, 消化管)	49	614	0.8
4 58/男	なし	2 (腎臓, 消化管)	75	17	1.4
5 48/男	なし	3 (心臓, 腎臓, 消化管)	54	1,041	0.6
6 32/男	なし	2 (腎臓, 末梢神経)	61	14	0.8
7 63/女	なし	2 (腎臓, 消化管)	57	11	0.4
8 56/女	なし	2 (腎臓, 消化管)	69	20	0.8

EF: ejection fraction, BNP: brain natriuretic peptide (正常値: 18.4 pg/mL 以下)。

臓器障害の有無は腎臓, 消化管に関しては生検のアミロイド沈着により評価した。心臓は本文を参照。神経系の障害は臨床所見から診断した。

施行前の収縮期血圧



PBSCH 施行時収縮期血圧の推移

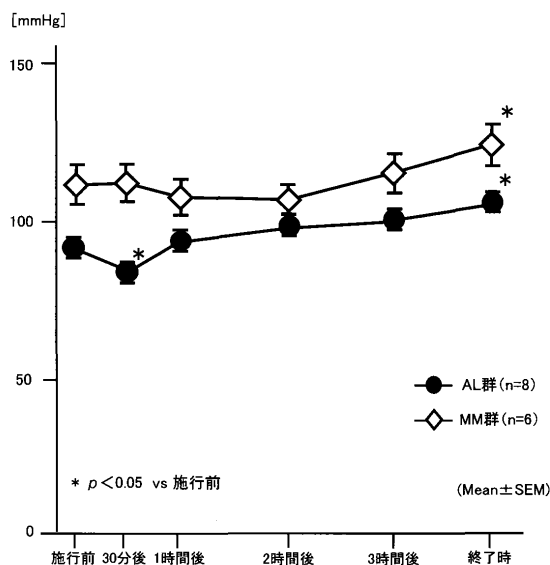


図 1 PBSCH 施行時血圧と推移

PBSCH: peripheral blood stem cell harvest.

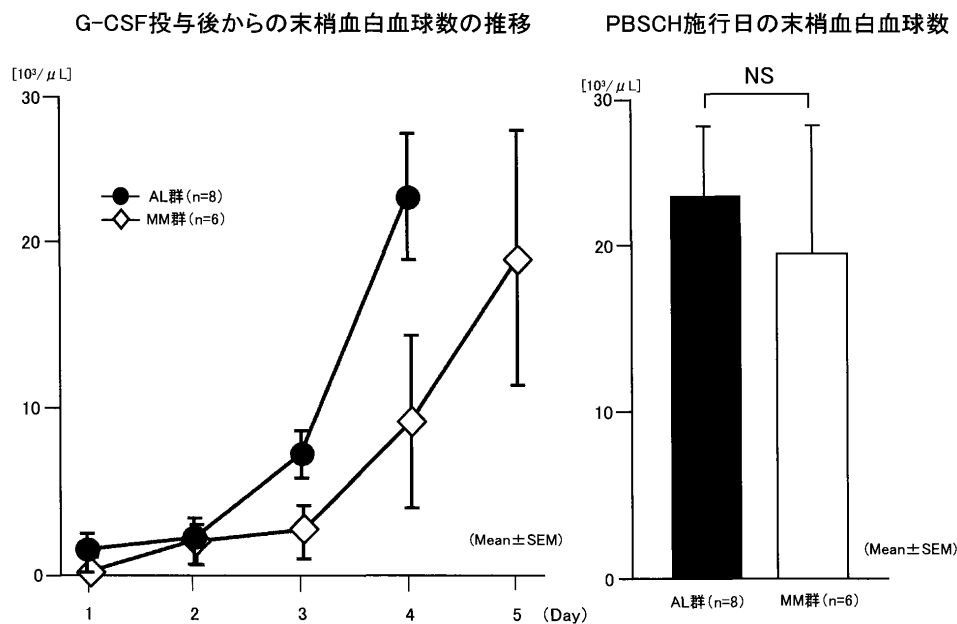


図2 G-CSF投与による末梢血白血球数増加の推移
G-CSF: granulocyte colony stimulating factor.

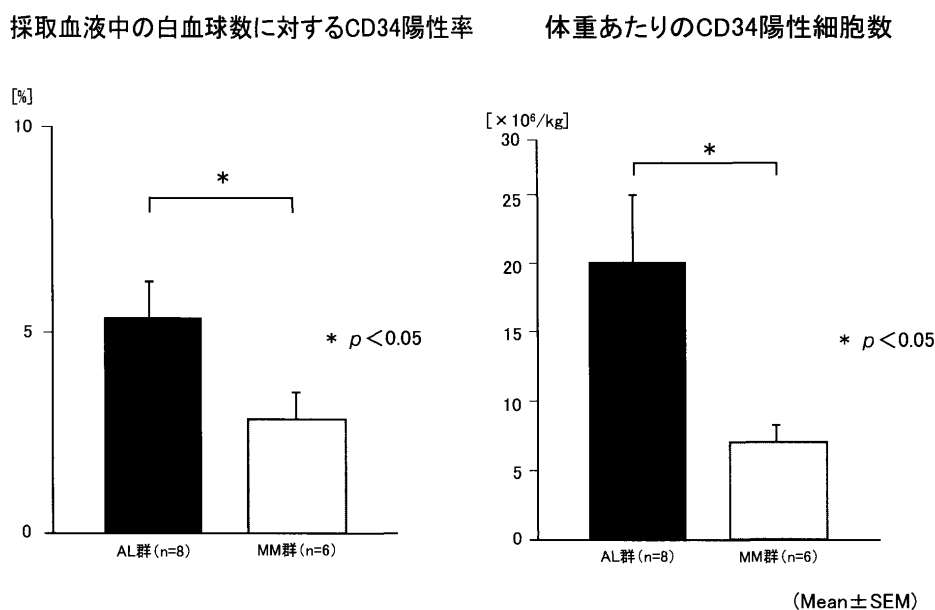


図3 採取血中 CD34 陽性細胞率と体重あたりの CD34 陽性細胞数

3.2 PBSCH 施行における血圧の推移 (図1)

PBSCH 施行直前の AL 群の収縮期血圧は 90.8 ± 2.7 mmHg で、MM 群 (111.0 ± 6.2 mmHg) に比べ有意に低かった ($p = 0.01$)。施行中の収縮期血圧は AL 群では開始 30 分後に全症例で一過性に血圧低下 (83.4 ± 2.5 mmHg, $p < 0.01$) がみられたが 1 時間後には回復し、逆に終了時には有意な血圧の上昇 (104.8 ± 1.9 mmHg, $p < 0.001$) がみられた。MM 群では早期の血圧低下はなく、PBSCH 終了時には有意な血圧の上昇

がみられた。

3.3 G-CSF 投与後の白血球数の推移 (図2)

G-CSF 投与後、AL 群および MM 群の末梢血白血球数は順調に増加した。AL 群では全症例で投与 4 日目に $24,300 \pm 4,000/\mu\text{L}$ と PBSCH 施行可能となる値まで到達したため施行した。一方、MM 群は全症例で投与 5 日目に $20,400 \pm 8,188/\mu\text{L}$ と増加し、PBSCH 施行可能となる値まで到達したため施行した。したがって AL 群では MM 群に比べ 1 日速く PBSCH を施行

した。PBSCH 施行前の末梢血白血球数に両群で有意差はみられなかった。G-CSF 投与後の末梢血の単球数、リンパ球数の推移は AL 群が MM 群に比べ有意に増加率が高かった。

3.4 CD34 陽性細胞数および採取効率 (図 3)

採取血液量は AL 群で 151.0 ± 2.4 mL, MM 群で 154.8 ± 2.2 mL と両群に有意差はなかった。採取血液内の白血球総数に対する CD34 陽性率は AL 群で $5.2 \pm 1.0\%$, MM 群の $2.8 \pm 0.7\%$ に比べ有意に高く、さらに体重あたりの CD34 陽性細胞数においても MM 群の 6.9×10^6 個に対し AL 群では 20.1×10^6 個と多く、採取効率は AL 群で高いため治療に十分な造血幹細胞が得られた。MM 群でも治療に必要な細胞数が得られ、実際の PBSCH 施行回数は AL 群ではすべて 1 回であり、MM 群でも 2 回施行せざるを得なかった症例は 1 例のみであった。

4. 考 察

近年、AL アミロイドーシス治療の一つとして行われるようになった auto-PBSCT に際しての PBSCH では安全性と採取効率が重要なポイントの一つである。今回の検討では心アミロイドーシスを合併した症例が半数にも関わらず PBSCH 施行に伴い循環動態が破綻する症例はなく安全に施行することができた。さらに AL アミロイドーシスでは同じ形質細胞異常症を有する MM と比べても、既往として化学療法が行われていないことが多いため、幹細胞採取効率が高いなど有効な治療効果を得るために必要な条件を有する可能性が示唆された。

PBSCH 施行時に生じる体外循環に関連する合併症としては脱血不良とクエン酸中毒が考えられる。一般的にヴァスキュラーアクセスは 2 本の末梢静脈路を用いるが、本検討においては全症例、右内頸静脈に DLC を留置したことで十分な血流量が得られるようになり、脱血不良によるトラブルは皆無であった。また、前日の DLC 挿入直後から管内血栓予防として携帯型ディスプレイ微量注入ポンプを用いてヘパリンを持続投与したことにより DLC 管内の血栓閉塞などの合併症はなく、安定した血流を確保することが可能であった。

PBSCH では大量の ACD-A 液を用いるため、カルシウムイオンがキレートされてしまい、しばしば低カルシウム血症による「クエン酸中毒」を起こすことがある。クエン酸中毒に対してはカルシウムの補充が必

要であり定期的なカルシウムイオンの血中濃度のモニタリングが必要である。本検討での症例ではあらかじめグルコン酸カルシウムを持続的に投与し予防するとともに、モニタリングとして開始 1 時間後と 2 時間後の 2 点で血液ガス分析を行いイオン化カルシウム値を測定した。イオン化カルシウムが低値の場合は持続投与量の増加や単回投与を適宜行うことにより、重篤なクエン酸中毒を未然に防ぐことができたと考えられた。しかし、より安全に施行するためには患者の体重、性別、基礎疾患、臓器障害の程度などから最適なカルシウム投与量の指標を作成する必要があると考えられた。

心アミロイドーシスでは収縮能は比較的保たれるが拡張障害が強く低血圧になりやすい⁸⁾。心不全を呈した場合は循環作動薬や利尿剤といった薬物療法の適応になるが、本検討においては明らかな心不全症例はなかった。AL 群では組織学的診断や心エコー検査に基づく心アミロイドーシスの診断は半数の 4 症例であったため、PBSCH 施行前の収縮期血圧において MM 群に比べ有意に低値であったと考えられた。また、本検討において AL 群の収縮期血圧は PBSCH 開始 30 分で一過性に低下したが、昇圧剤の投与や大量輸液といった処置は必要なかった。その後は ACD-A 液などの輸液負荷 (約 200 mL/hr) により経時的に収縮期血圧は上昇したと考えられた。アミロイド線維は心臓、腎臓、消化管などの臓器に加え、血管基底膜や血管内皮細胞など広範に沈着し、細動脈が肥厚する⁹⁾。また、アミロイドニューロパチー合併症では、自律神経障害から血管の自動調節能が障害される¹⁰⁾。これらのことから体外循環開始直後における血管内容量の低下に対し、自律神経とそれに伴う血管収縮が十分に起きずに血圧低下を来した可能性が考えられる。したがって PBSCH 施行時の体外循環開始早期の一過性の低血圧に対しては容量負荷を行うことにより改善する可能性が考えられた。

AL アミロイドーシスにおける PBSCH 施行開始早期の血圧低下に対しては高張アルブミン製剤の投与が有用であったとの報告がある¹¹⁾。しかし、PBSCH では ACD-A 液や生理食塩水などの血管内容量の負荷は約 1,000 mL におよび、心機能や腎機能が低下している症例では容易に溢水となりうる。低血圧時の高張アルブミン製剤などの適応についてはさらに十分な検討が必要であろう。幸い、本検討においては、高張アルブミン製剤や昇圧剤の使用、著しい低血圧の遷延など重篤な症状を認めず安全に施行が可能であった。

PBSCHの施行時は患者背景、合併臓器障害などを十分に評価することが、安全なPBSCH施行には必要であると考えられる。

化学療法とG-CSFを併用したPBSCH施行には最低でも末梢血白血球数が5,000/ μ L以上必要で、G-CSF投与により、4~6日目でその基準に達することが報告されている¹²⁾。しかし、ALアミロイドーシスに対するauto-PBSCT施行に際してのG-CSF投与による白血球数の動態などは十分に検討されていない。本検討において、AL群はMM群に比べG-CSF投与後からの末梢血の白血球数、単球数、リンパ球数、いずれも増加率が高く、さらに採取血液中のCD34陽性細胞数においても有意に高値であった。これはALアミロイドーシス症例では既往として化学療法が行われていないことが多いため、他のauto-PBSCT適応疾患に比べて骨髓予備能が温存されている可能性があり、それにより、各因子の増加率が高く、末梢血中の幹細胞動員も多いという可能性が考えられた。一方、MM群は既に治療として数回の化学療法が施行されていたため、末梢血白血球数の増加率が低いのではないかと考えられた。

ALアミロイドーシスにおけるPBSCHは心アミロイドーシスの合併から心機能が低下している患者が多い。そのため慎重な体外循環が要求され、単回の施行で目標量を採取することが望ましく、採取効率が重要な問題となる。ALアミロイドーシスにおけるPBSCHはG-CSF投与から末梢血へのCD34陽性細胞の動員が速く、G-CSF投与とPBSCH施行のタイミングを担当医師と施行担当の臨床工学技士などが十分に協議することにより施行回数を最小限にすることが可能になると考えられる。今回の検討で、PBSCH施行回数はAL群とMM群とでは有意な差はなかったが、明らかに採取効率はAL群で高かった。MM症例においてもPBSCHで治療に必要な造血幹細胞が得られたが、ALアミロイドーシスではより少ない施行時間で目標採取量が得られる可能性が考えられた。したがって今後、ALアミロイドーシス患者におけるPBSCH施行時の血流量や施行時間などの施行条件についてさらなる検討が必要である。

5. 結 語

ALアミロイドーシスにおけるPBSCHの安全性とCD34陽性細胞採取効率について検討した。PBSCH

施行時においては心機能が低下している症例が多いため開始直後の血圧低下に十分留意する必要がある。CD34陽性細胞採取も効率良く行うことができた。患者背景、合併臓器障害などを十分に把握することにより、安全かつ効率の良いPBSCH管理が可能となると考えられる。

文 献

- 1) Kyle RA, Gertz MA: Primary systemic amyloidosis: Clinical and laboratory features in 474 cases. *Semin Hematol* **32**: 45-59, 1995
- 2) 山田正仁: アミロイドーシス診療ガイドライン 2010. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業アミロイドーシスに関する調査研究班, pp 9-13, 2010
- 3) Moreau P, Leblond V, Bourquelot P, et al: Prognostic factors for survival and response after high-dose therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation in systemic AL amyloidosis: A report on 21 patients. *Br J Haematol* **101**: 766-769, 1998
- 4) Comenzo RL, Vosburgh E, Falk RH, et al: Dose-intensive melphalan with blood stem-cell support for the treatment of AL (amyloid light-chain) amyloidosis: Survival and responses in 25 patients. *Blood* **91**: 3662-3670, 1998
- 5) Gertz MA, Lacy MQ, Gastineau DA, et al: Blood stem cell transplantation as therapy for primary systemic amyloidosis (AL). *Bone Marrow Transplant* **26**: 963-969, 2000
- 6) Qaiser B, Lauren AL, Simrit P, et al: Primary systemic amyloid light chain amyloidosis decompensating after filgrastim-induced mobilization and stem-cell collection. *J Clin Oncol* **29**: 79-80, 2011
- 7) Skinner M, Sancherawala V, Seldin DC, et al: High-dose melphalan and autologous stem-cell transplantation in patients with AL amyloidosis: An 8-year study. *Ann Intern Med* **140**: 85-93, 2004
- 8) Claudio R, Giampaolo M, Candida C, et al: Systemic cardiac amyloidosis disease profiles and clinical courses of the 3 main type. *Circulation* **29**: 1203-1212, 2009
- 9) Sasatomi Y, Kiyoshi Y, Uesugi Y, et al: Prognosis of renal amyloidosis: A clinicopathological study using cluster analysis. *Nephron* **87**: 42-49, 2001
- 10) Benson MD, Kincaid JC: The molecular biology and clinical features of amyloid neuropathy. *Muscle & Nerve* **36**: 411-423, 2007
- 11) Casare P, Claudia DF, Gianluca V, et al: Peripheral blood progenitor cell mobilization and collection in 42 patients with primary systemic amyloidosis. *Transfusion* **45**: 1729-1734, 2005
- 12) Bensinger W, DiPersio JF, McCarty JM: Improving stem cell mobilization strategies: Future directions. *Bone Marrow Transplant* **43**: 181-195, 2009

連絡先: 〒060-8543 札幌市中央区南1条西16丁目 札幌医科大学附属病院臨床工学部 千原伸也 Tel.011-611-2111, Fax.011-631-2650, E-mail:s.chihara@sapmed.ac.jp