

原 著

末梢血幹細胞採取における採取前 CD 34 陽性細胞数測定の有用性

佐藤 典宏 茂木 祐子 上田恵里奈 金井ひろみ
小島 聡 中瀬 俊枝 池淵 研二 関口 定美

北海道赤十字血液センター

(平成 10 年 9 月 24 日受付)

(平成 11 年 3 月 16 日受理)

EFFICACY OF MEASUREMENT OF CD 34⁺ CELLS IN PERIPHERAL BLOOD BEFORE LEUKAPHERESIS FOR COLLECTION OF PERIPHERAL BLOOD PROGENITOR CELLS

Norihiro Sato, Yuko Mogi, Erina Ueda, Hiromi Kanai, Satoshi Kojima,
Toshie Nakase, Kenji Ikebuchi and Sadayoshi Sekiguchi
Hokkaido Red Cross Blood Center

We evaluated the efficacy of measurement of CD 34⁺ cells in peripheral blood (PB) before leukapheresis (LA). Forty-five patients with malignant diseases underwent 65 LAs for collection of peripheral blood progenitor cells (PBPC). Median values for white blood cells (WBC), mononuclear cells (MNC) and CD 34⁺ cells in PB before LA were 18,900/ μ l, 3,110/ μ l and 39.6/ μ l, respectively. Median values for CD 34⁺ cells, colony forming unit-granulocyte/macrophage (CFU-GM) and total colony forming cells (CFC) in LA products were 3.19×10^6 /kg, 5.79×10^5 /kg and 12.90×10^5 /kg, respectively. The strong correlation between CD 34⁺ cells and CFU-GM or CFC ($r=0.88$ and 0.87) indicates that the number of CD 34⁺ cells represents clonogenic activity. Regression analysis revealed a very strong correlation between CD 34⁺ cells in LA products (Y) and those in PB before LA (X) ($r=0.97$, $Y=5.43 \times 10^5 X - 37.2 \times 10^5$), while only a weak correlation was seen between CD 34⁺ cells in LA products and the number of WBC and MNC in PB before LA ($r=0.60$ and 0.56). These results indicated that the number of CD 34⁺ cells in PB before LA can accurately predict that in LA products. We therefore conclude that the measurement of CD 34⁺ cells in PB before LA is useful in the collection of PBPC with LA.

Key words : CD 34⁺ cells, leukapheresis, peripheral blood progenitor cells, prediction

はじめに

近年、自己末梢血幹細胞移植 (autologous peripheral blood stem cell transplantation, auto-PBSCT) の施行症例が増加している¹⁾²⁾。その理由は骨髓移植と比較して細胞採取において患者の負担が少ないこと、移植後の血球回復が早いことなどが挙げられる。一方、PBSCTにおける造血幹細胞の採取は連続成分採血装置を用いたアフエレーシスによって行われるが、患者の負担およびコストの面等から少ない回数のアフエレーシスで十分

量の幹細胞が採取されることが望ましい。そのため、一回の処理血液量を増加させた大量採取法も報告されている³⁾⁴⁾が、長時間におよぶ採取のため患者の負担は少ない。ここで採取される細胞数が予測可能であれば、患者にかかる負担を軽減した効率的な採取ができる。最近、採取される CD 34 陽性細胞数は採取前の末梢血 CD 34 陽性細胞数に相関する、という報告がされている^{5)~11)}が、その測定意義について疑問を呈する報告もされている¹²⁾¹³⁾。今回、我々は採取される CD 34 陽性細胞

数と末梢血血液所見の関係を検討し、採取前のCD 34 陽性細胞測定の有用性について検討したので報告する。

材料と方法

1. 対象

1996年4月から1998年7月まで北海道赤十字血液センターで末梢血幹細胞採取を行った患者を対象とした。

2. 末梢血幹細胞採取法

末梢血幹細胞の動員は各疾患ごとに施行された化学療法後の白血球回復期に顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) を投与して行った。

細胞採取は連続成分採血装置 (Spectra, COBE Laboratories, Lakewood, CO) を用い、採取および返血は中心静脈に挿入したダブルルーメンカテーテルまたは中心静脈に挿入したシングルルーメンカテーテルと正中肘静脈から行った。採取速度は45~75 ml/min., 全血対 ACD 比は12.0~13.0とした。処理血液量は患者の末梢血 CD 34 陽性細胞数と目標採取 CD 34 陽性細胞数より、4.5~18.0 L の範囲で行った。

3. 検査法

末梢血幹細胞採取前の末梢血および採取細胞について血算、CD 34 陽性細胞を測定した。また、採取細胞についてはコロニーアッセイも行った。

血算は自動血球計測装置 (ONYX, Coulter, Miami, FL) を用いた。CD 34 陽性細胞の測定は以下の要領で行った。末梢血またはアフエレーシス採取細胞 5×10^5 個に抗 CD 34 抗体 (anti-HPCA-2, Becton Dickinson, San Jose, CA) または陰性コントロール (anti-mouse IgG 1, DAKO A/S, Denmark) を添加し、4℃で20分反応させた。NH₄Cl を添加し、5~10分間放置し、遠心後上清を除去し、PBSで細胞を浮遊させた。CYTORON (Ortho Diagnostic System, Raritan, NJ) を用いて CD 34 陽性細胞率を計測し、自動血球計測装置の白血球数から CD 34 陽性細胞絶対数を求めた。CYTORON による計測細胞数は CD 34 陽性細胞数100個以上または全計測細胞数200,000個以上とした。本方法で定常状態の同一検体の末梢血 (CD

34 陽性細胞 3/ μ l 以下) を2度測定した場合、一方を100%とした時、他方は $118.8 \pm 5.6\%$ であった。

コロニーアッセイは既報¹⁴⁾の培養液を用い、アフエレーシス採取細胞を $0.2 \sim 20 \times 10^4$ /ml の濃度で添加し、35 mm 培養皿に播種した。37℃, 5% CO₂ 下で2週間培養した後、倒立顕微鏡下でコロニーを算定した。コロニーは顆粒球-マクロファージコロニー (colony forming unit-granulocyte/macrophage, CFU-GM), 赤芽球コロニー (burst forming unit-erythroid, BFU-E) および混合コロニー (CFU-Mixed, CFU-Mix) を判定し、それらの合計をコロニー形成細胞 (colony forming cell, CFC) とした。

4. 統計学的解析

各計測値間の相関および回帰は統計解析用ソフト (StatView 4.5, Abacus Concepts, Berkeley, CA) を用いて行った。

結 果

1. 採取前の末梢血所見およびアフエレーシスの結果

45名の患者に65回の末梢血幹細胞採取を行った。患者背景をTable 1に示す。年齢の中央値は47歳であった。疾患は非ホジキンリンパ腫が約半数であるが、種々の固形腫瘍も含まれていた。

採取前の末梢血所見をTable 2に示す。採取前白血球数、単核球数の中央値はそれぞれ18,900/ μ l, 3,110/ μ l であった。CD 34 陽性細胞数の中央値は39.6/ μ l であったが、その範囲は1.12~368.5/ μ l と個人差が大きかった。

2. 末梢血幹細胞採取の結果

採取の結果をTable 3に示す。65回の採取における処理血液量の中央値は11.4 L であった。また、CD 34 陽性細胞数、CFU-GM 数、CFC 数の中央値はそれぞれ、 3.19×10^6 /kg, 5.79×10^5 /kg, 12.90×10^5 /kg であった。採取細胞中の CD 34 陽性細胞数とコロニー形成細胞数の相関をFig. 1に示した。CFU-GM (Fig. 1-A), CFC (Fig. 1-B) の相関係数はそれぞれ0.88, 0.87であり、強い正の相関を示した。

3. 採取 CD 34 陽性細胞数と採取前末梢血 CD 34 陽性細胞数、白血球数および単核細胞数との関

Table 1 Patients' characteristics

Number	45
Age median (range)	47 (13—67)
Sex M/F	21/24
Diagnosis	
Acute myelogenous leukemia	4
Hodgkin's disease	2
Non-Hodgkin's lymphoma	22
Multiple myeloma	7
Ovarian cancer	4
Breast cancer	2
Pharyngeal tumor	2
Lung cancer	1
Neuroblastoma	1

Table 2 Hematological findings in peripheral blood before leukapheresis

White blood cells (/μl)	18,900	(4,300 — 67,100)
Mononuclear cells (/μl)	3,110	(420 — 8,350)
Hemoglobin (g/dl)	10.2	(7.9 — 14.6)
Platelets (× 10 ⁴ /μl)	13.3	(6.1 — 30.0)
CD34 ⁺ cells (%)	0.22	(0.004 — 1.10)
	39.6	(1.12 — 368.5)
median (range)		

Table 3 Results of leukapheresis

Processed blood volume (L)	11.4	(3.5 — 17.0)
Collected cell number		
White blood cells (× 10 ⁸ /kg)	3.49	(1.01 — 7.55)
Mononuclear cells (× 10 ⁸ /kg)	2.27	(0.33 — 5.15)
CD34 ⁺ cells (× 10 ⁶ /kg)	3.19	(0.10 — 24.45)
CFU-GM (× 10 ⁵ /kg)	5.79	(0.11 — 41.49)
BFU-E (× 10 ⁵ /kg)	5.70	(0.20 — 30.60)
CFU-Mix (× 10 ⁵ /kg)	0.29	(0.00 — 3.25)
CFC (× 10 ⁵ /kg)	12.90	(0.32 — 67.45)
median (range)		

係

採取される CD 34 陽性細胞数を予測する指標としての有用性を評価するため、処理量 1 L あたりの採取 CD 34 陽性細胞数と末梢血測定値との相関性を検討した (Fig. 2)。

処理量 1 L あたりの採取 CD 34 陽性細胞数と採取前末梢血 CD 34 陽性細胞数は極めて強い正の相関を示した (Fig. 2-A, $r=0.97$, $n=65$)。これに対し、白血球数、単核球数はいずれも弱い正の相関を示した (WBC : Fig. 2-B, $r=0.60$, $n=65$; MNC :

Fig. 2-C, $r=0.56$, $n=65$)。

これらの 3 つの末梢血測定値の指標 (X_1 : CD 34 陽性細胞数 ; /μl, X_2 : 白血球数 ; × 10⁴/μl, X_3 : 単核球数 ; × 10³/μl) と採取 CD 34 陽性細胞数 (Y ; × 10⁷/L) の回帰式はそれぞれ、 $Y=5.43 \times 10^5 X_1 - 37.2 \times 10^5$, $Y=1.93 \times 10^3 X_2 - 1.17 \times 10^7$, $Y=1.26 \times 10^4 X_3 - 1.47 \times 10^7$ となった。いずれも正の相関関係を示すことから採取 CD 34 陽性細胞の予測が可能と考えられるが、95% 信頼区間 (Fig. 2, 細線で示す範囲内) は CD 34 陽性細胞数では極めて狭いのに対し、白血球数、単核球数では比較的広がった。得られた上記の回帰式にそれぞれの中央値 (CD34⁺ cells : 39.6/μl, WBC : 18,900/μl, MNC : 3,110/μl) を当てはめると、採取される CD 34 陽性細胞数の 95% 信頼区間は、 $1.38 \sim 2.18 \times 10^7/L$, $-0.29 \sim 5.28 \times 10^7/L$, $-0.80 \sim 5.69 \times 10^7/L$ と計算された。これは、採取前末梢血 CD 34 陽性細胞数を指標にした場合、予想される採取 CD 34 陽性細胞数の範囲が極めて狭いことを示している。

考 案

PBSCT において、移植に必要十分量の細胞を効率よく採取することは重要である。Auto-PBSCT では移植の指標として CD 34 陽性細胞数が用いられている²⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。我々の検討でも、CD 34 陽性細胞とコロニー形成細胞は極めて強い正の相関を示すことから (Fig. 1), コロニー形成能という生物活性の面からも CD 34 陽性細胞を指標とすることは適切であると考えられる。

アフエレーシスによって採取される CD 34 陽性細胞の予測法は明らかではなかったが、近年、採取前の末梢血 CD 34 陽性細胞数が採取される CD 34 陽性細胞数に相関するという報告がみられる^{5)~11)}。一方、Benjamin らは、その相関係数は必ずしも高くなく、有効性に乏しいと報告している¹²⁾¹³⁾。相関するとした報告の相関係数は 0.77~0.94 であり、Benjamin らのそれは 0.74 である。Benjamin らは、相関するとして多くの報告は測定値を対数変換して計算しており、相関関係を正確に反映していないとし、対数変換をしていない報告に関しては、対象となる患者群が均一であるため相関性が強く出ていると指摘している¹³⁾。

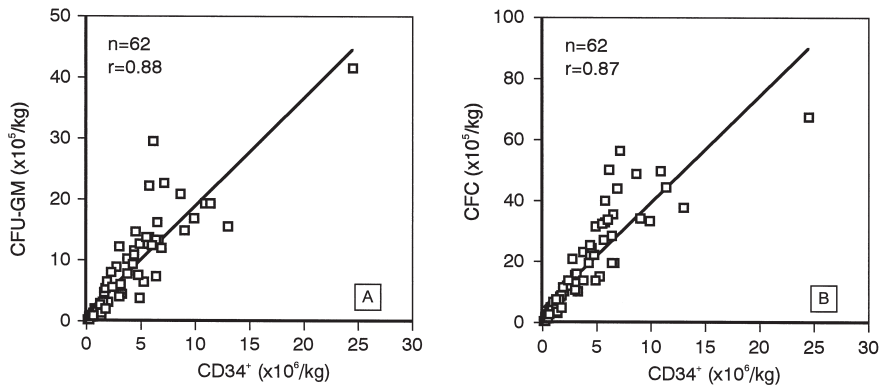


Fig. 1 Correlation between the number of CD 34⁺ cells and clonogenic cells in leukapheresis products.

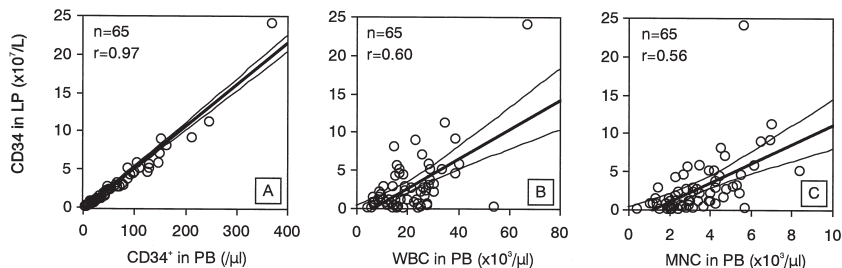


Fig. 2 Correlation between the number of CD 34⁺ cells in leukapheresis products and white blood cells, mononuclear cells and CD 34⁺ cells in peripheral blood before leukapheresis.

我々の結果は、対数変換しない値で相関係数が0.97であり、また、患者群も造血器腫瘍から固形癌まで多岐にわたっており、採取前の末梢血と採取されたCD 34陽性細胞が相関するという報告を支持するものである。

CD 34陽性細胞の相関性に関する臨床的意義は、Bandarenkoらは迅速にCD 34陽性細胞数を測定することにより、アフェレーシスの開始日を決定でき有用であると報告している¹¹⁾。これに対し、Benjaminらは白血球数を指標にするだけで十分であるとしている¹³⁾。採取前の白血球数と採取されるCD 34陽性細胞数の相関係数は既報では0.04~0.43と低く⁷⁾⁹⁾¹⁰⁾、我々の結果でも0.60であった。我々の値は正の相関関係を示すが弱い関係であり、回帰式から得られた95%信頼区間も比較的広い範囲となった。従って、白血球数を指標とすることは、採取されるCD 34陽性細胞数の変

動幅がかなり広いことを意味し、臨床的有用性では限界があると考えられる。実際に採取前の白血球数の中央値18,900/ μ lでの採取CD 34陽性細胞の95%信頼区間の範囲は $-0.29 \sim 5.28 \times 10^7/L$ であり、これは十分量のCD 34陽性細胞が採取できる場合からほとんど採取できない場合までがあり得ることを示している。これに対し、採取前末梢血CD 34陽性細胞数は極めて強い正の相関を示し、回帰式から得られる95%信頼区間も狭い。従って、我々はCD 34陽性細胞数の測定には1時間も要しないことから、その結果の臨床的な応用が可能であると考えられる。

採取CD 34陽性細胞数と採取前末梢血CD 34陽性細胞数の回帰式を応用すると、アフェレーシスにおける処理血液量を予測することが可能である。採取細胞数は処理量1Lあたりの採取CD 34陽性細胞数で計算されている。すなわち、採取前

CD 34 陽性細胞数の中央値 $39.6/\mu\text{l}$ での採取量の 95% 信頼区間は $1.38 \sim 2.18 \times 10^7/\text{L}$ である。ここで、患者体重を 60 kg、目標 CD 34 陽性細胞数を $2 \times 10^6/\text{kg}$ とすると必要採取量は 120×10^6 である。この仮定値と上記の信頼区間から計算すると、血液処理量の値は $5.5 \sim 8.7 \text{ L}$ となる。PBSCT においては末梢血に動員される CD 34 陽性細胞数の個人差が大きいため、十分に動員されている患者においては不必要なアフエレーシスが行われている可能性がある。このような場合では、予測式を参考に処理量を設定することにより、必要以上に大量の血液処理量による採取を避けることができる。従って、採取前の末梢血 CD 34 陽性細胞を測定することは、患者に負担が少なく、安全な採取を行う上からも意義が大きいと考えられる。

コストの面から考えると、我々が採用した測定方法は抗 CD 34 抗体及び陰性抗体の費用がかかるのみであり、価格にして 1,500 円程度である。上記のように予測に基づき過剰な採取をしない場合に軽減できる凍結バッグ、凍害保護液の量を考えると、採取前末梢血 CD 34 陽性細胞数を測定することはコスト面でも有益であると考えられる。また、CD 45 抗体との二重染色による CD 34 陽性細胞数の測定が推奨されているが、我々は末梢血およびアフエレーシス細胞の場合は、十分な溶血操作を行うことにより、方法の項でも記したように再現性のある結果を得ている。従って、我々はコスト面も考慮し、CD 34 抗体の単染色を行っている。

近年、末梢血中の幼弱細胞数が CD 34 陽性細胞数に相関し、その測定機種も開発されており、それらの相関係数は $r=0.826$ であると報告されている¹⁷⁾。これは比較的高い値であり、アフエレーシス開始日の決定には有用であろう。しかし、採取される CD 34 陽性細胞数を推定し処理血液量を設定することに利用しようとした場合には、推定できる採取量または処理血液量の変動幅は広すぎる。従って、目的に応じて検査法を選択し、アフエレーシスに応用することが望ましいと考えられる。

ま と め

アフエレーシスにより採取される CD 34 陽性細胞数は採取前の末梢血 CD 34 陽性細胞数と強い正の相関を示し、採取量の予測が可能であることが示された。よって、採取前の末梢血 CD 34 陽性細胞数の測定は、患者に対して安全で効率的な採取を行う上で有用であると考えられる。

文 献

- 1) Gratwohl A, Hermans J and Baldomero H, et al : Hematopoietic precursor cell transplants in Europe : activity in 1994. Report from the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Bone Marrow Transplant 17 ; 137—148, 1996.
- 2) Watts MJ and Linch DC : Peripheral blood stem cell transplantation. Vox Sang 73 ; 135—142, 1997.
- 3) Malachowski ME, Comenzo RL, Hillyer CD et al : Large-volume leukapheresis for peripheral blood stem cell collection in patients with hematologic malignancies. Transfusion 32 ; 732—735, 1992.
- 4) Smolowicz AG, Villman K, and Tidefelt U : Large-volume apheresis for the harvest of peripheral blood progenitor cells for autologous transplantation. Transfusion 37 ; 188—192, 1997.
- 5) Haas R, Möhle R, Frühauf S et al : Patient characteristics associated with successful mobilizing and autografting of peripheral blood progenitor cells in malignant lymphoma. Blood 83 ; 3787—3794, 1994.
- 6) Frühauf S, Haas R, Conradt C et al : Peripheral blood progenitor cell (PBPC) counts during steady-state hematopoiesis allow to estimate the yield of mobilized PBPC after filgrastim (R-metHuG-CSF)-supported cytotoxic chemotherapy. Blood 85 ; 2619—2626, 1995.
- 7) Möhle R, Murea S, Pförsich M et al : Estimation of the progenitor cell yield in a leukapheresis product by previous measurement of CD 34⁺ cells in the peripheral blood. Vox Sang 71 ; 90—96, 1996.
- 8) Schots R, Van Riet I, Damiaens S et al : The absolute number of circulating CD 34⁺ cells predicts the number of hematopoietic stem cells that can be collected by apheresis. Bone Marrow Transplant 17 ; 509—515, 1996.
- 9) Elliott C, Samson DM, Armitage S et al : When to harvest peripheral-blood stem cells after mobili-

- zation therapy : prediction of CD 34-positive cell yield by preceding day CD 34-positive concentration in peripheral blood. *J Clin Oncol* 14 ; 970—973, 1996.
- 10) Areman EM, Meehan KR, and Sacher RA et al : Preapheresis levels of peripheral blood CD 34⁺ cells correlate with CD 34⁺ peripheral blood progenitor cells in autologous patients. *Transfusion* 37 ; 1217, 1997.
 - 11) Bandarenko N, Sims LC, and Brecher ME : Circulating CD 34⁺ cell counts are predictive of CD 34⁺ peripheral blood progenitor cell yields. *Transfusion* 37 ; 1218, 1997.
 - 12) Benjamin RJ, Linsley L, Fountain D et al : Preapheresis peripheral blood CD 34⁺ mononuclear cell counts as predictors of progenitor cell yield. *Transfusion* 37 ; 79—85, 1997.
 - 13) Benjamin RJ and Wheeler C : *Transfusion* 37 ; 1218—1220, 1997.
 - 14) Sato N, Sawada K, Takahashi TA et al : A time course study for optimal harvest of peripheral blood progenitor cells by granulocyte colony-stimulating factor in healthy volunteers. *Exp Hematol* 22 : 973—978, 1994.
 - 15) Bender JG, To LB, Williams S et al : Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells. *J Hematother* 1 ; 329—341, 1992.
 - 16) Bensinger W, Singer J, Appelbaum F et al : Autologous transplantation with peripheral blood mononuclear cells collected after administration of recombinant granulocyte stimulating factor. *Blood* 81 ; 3158—3163, 1993.
 - 17) 西郷勝康, 他 : 末梢血幹細胞採取時期決定における多項目自動血球分析装置 SE-9000 の有用性. *日本輸血学会誌*, 44 ; 605—609, 1998.
-