Japanese Journal of Transfusion Medicine, Vol. 45. No. 5　45(5)：611—616, 1999

Avidin-Biotin Immunoadsorption System を用いた CD34 陽性細胞の採取効率

矢野　真吾[1)2)]　浅井　治[1)2)]　加藤　明徳[1)2)]　渡辺　浩[1)2)]
香取美津治[1)2)]　長峰　守[1)2)]　矢萩　裕一[1)2)]　牧　信子[1)3)]
小林　直[1)2)]　星　順隆[3)]　田嶋　尚子[2)]　倉石　安庸[1)2)]

[1)]東京慈恵会医科大学附属病院血液・腫瘍内科
[2)]東京慈恵会医科大学内科学講座第 3
[3)]東京慈恵会医科大学附属病院輸血部

（平成 10 年 11 月 20 日受付）
（平成 11 年 4 月 15 日受理）

FEASIBILITY OF CD34-POSITIVE SELECTION USING THE AVIDIN-BIOTIN IMMUNOADSORPTION SYSTEM

Shingo Yano[1)2)], Osamu Asai[1)2)], Akinori Kato[1)2)], Hiroshi Watanabe[1)2)], Mituji Katori[1)2)], Mamoru Nagamine[1)2)], Yuichi Yahagi[1)2)], Nobuko Maki[1)3)], Tadashi Kobayashi[1)2)], Yasutaka Hoshi[3)], Naoko Tajima[2)] and Yasunobu Kuraishi[1)2)]
[1)]Department of Hematology/Oncology, Jikei University Hospital
[2)]Department of Internal Medicine（III）, Jikei University School of Medicine
[3)]Department of Transfusion Medicine, Jikei University Hospital

To investigate the feasibility of CD34-positive selection, we separated $CD34^+$ cells from KG1a cells, fresh bone marrow samples（obtained from 2 ALL patients, 1 NHL, 1 breast cancer and 4 healthy volunteers）and frozen samples（3 ALL）by the avidin-biotin immunoadsorption using a *CEPRATE LC KITS*®（*CellPro Inc.*）. We then detected minimal residual disease (MRD) from a separated Ph-positive ALL fresh sample by the PCR method. The yield of selected $CD34^+$ cells were 78.9%（KG 1a cells）, 45.5%（fresh bone marrow sample obtained from ALL, NHL and breast cancer）, 9.3%（healthy volunteers）and 3.9%（frozen sample obtained from ALL）. A sample of Ph ALL was able to eliminate MRD from the $CD34^+$ fraction. We conclude that CD34-positive selection by the avidin-biotin immunoadsorption is useful in fresh samples but not from frozen samples and we demonstrated that this procedure may deplete tumor cells in a patient with ALL.
Key words：CD34 positive selection, minimal residual disease

緒　言

造血器悪性腫瘍や一部の固形癌に対する自家造血細胞移植併用の大量化学療法，放射線療法は，有効かつ比較的安全な治療法として幅広く施行されている．しかし同種骨髄移植と比べ再発率が高く，その原因の一つとして移植細胞液中に混入した腫瘍細胞，すなわち minimal residual disease（MRD）が考えられている[1)]．移植細胞液から CD 34 抗原陽性細胞を選択回収（CD34 positive selection）すれば，混入する腫瘍細胞が減少する可能性があり，近年臨床応用されている．特に Baxter 社の immunomagnetic bead 法を用いた報告は数

Collect MNC fraction from sample
↓
Suspend in PBS with 1% BSA
↓
Added mouse anti-human CD34 Biotin (40 μl/ml)
↓
Incubate at room temperature for 25 minutes
↓
Add 1% BSA in PBS and centrifugation (3,000 rpm, 7minutes)
↓
Suspend in PBS with 1% BSA
↓
Pass the sample through avidin column

MNC : mononuclear cell

Fig. 1 Method of separating $CD34^+$ cells by the avidin-biotin immunoadsorption system using the CEPRATE LC KIT®.

多く，その有効性が認められている．

今回われわれは比較的報告の少ないCellPro社のCEPRATE LC KIT®を用いて，CD34抗原陽性細胞の採取効率について検討した．新鮮検体のほか凍結検体からも効率的に採取できるか，またMRDの除去効果についての考察も加えたので報告する．

対象および方法

1. CD34陽性細胞の選択回収

1）CEPRATE LC KIT®の原理および方法

CEPRATE LC KIT®は，avidin-biotin immunoadsorption（ABIA）を用いてCD34陽性細胞を分離するものである．1%BSA加phosphate buffered saline（PBS）で洗浄したmononuclear cell（MNC）を，biotinylated IgM抗ヒトCD34モノクロナール抗体（clone12.8；CellPro）（40μl/ml）と混和し，室温で25分間反応させた．抗体に反応させるMNCの濃度は，上限200×10^6cells/ml（<5 ml）に調節した．さらに1%BSA加PBSで洗浄し，3000rpmで7分間遠沈後，avidin columnを通過させた．CD34陽性細胞をavidin-biotin結合によりcolumn内に吸着させ，最初にcolumn内を通過したCD34陰性細胞（unadsorbed cell）を採取，ついでPBSで洗浄しながらcolumnを圧搾し，CD34陽性細胞（adsorbed cell）を回収した（Fig. 1）．

Table 1 Sample characteristics

Total numbers	12
Type of samples	
Established cell line	
KG1a	1
Fresh samples	
ALL	2
NHL	1
Breast ca.	1
Healthy	4
Frozen samples	
ALL	3

ALL : acute lymphoblastic leukemia
NHL : non-Hodgkin's lymphoma

2）CEPRATE LC KIT®の有用性の検討

CD34陽性のヒト白血病細胞株KG1a（SRLより供与）1×10^7個を，健常人から採取した末梢血単核球9×10^7個で10倍希釈し，洗浄後CEPRATE LC KIT®を用いてadsorbed cell，unadsorbed cellに分離した．分離前後の各層をCD34抗体（HPCA-2, clone 8G12；オーソ社）で反応させ，フローサイトメトリーでCD34陽性率を測定した．さらに新鮮検体8検体（急性リンパ性白血病（ALL）2，非ホジキンリンパ腫（NHL）1，乳癌1，健常人4），凍結検体3検体（ALL 3）を用いて，KG 1aと同様にadsorbed cell，unadsorbed cellに分離，CD34陽性率を測定した（Table 1）．新鮮検体は全検体骨髄採取液，凍結検体は骨髄採取液2検体，末梢血幹細胞採取液1検体であった．骨髄液から単核球を分離するには，Ficoll比重遠心法（1500rpm，20分）を用いた．凍結検体は細胞分離前に37℃恒温槽で急速解凍後ACD液と混和し，RPMI 1640で2回洗浄した．

3）細胞回収率

測定したadsorbed cell中のCD34陽性細胞数とpretreated cell中のCD34陽性細胞数の比から，CD34陽性細胞回収率（recovery rate of $CD34^+$ cells）を算出した．また処理後の単核球数の和とpretreated cell中の単核球数の比から，MNC回収率（recovery rate of MNC）も算出した（Table 2, 3）．

2. MRDの検出

1）reverse transcriptase polymerase chain re-

Table 2　Positive rate of CD34 cells and MNC

	n	Pretreated cell		Adsorbed cell		Unadsorbed cell	
		MNC（×10⁶）	CD34⁺（%）	MNC（×10⁶）	CD34⁺（%）	MNC（×10⁶）	CD34⁺（%）
Established cell line							
KG1a	1	100.0	8.4	8.3	79.9		
Fresh samples							
CD34⁺ ALL	1	464.4	72.5	133.5	97.1	384.2	65.0
CD34⁻ ALL	1	31.5	8.9	1.0	25.6	33.2	6.9
NHL	1	368.0	1.1	2.9	81.3	370.5	0.6
Breast ca.	1	19.8	0.6	0.8	7.8	16.9	0.4
Healthy	4	81.5*	6.0*	0.7*	61.9*	66.0*	3.0*
Frozen samples							
ALL	3	38.1*	20.8*	0.5*	52.3*	21.6*	9.7*

MNC : mononuclear cell　ALL : acute lymphoblastic leukemia
* : median　NHL : non-Hodgkin's lymphoma

Table 3　Recovery rate of CD34 cells and MNC

	Recovery rate of CD34⁺ cells（%）	Recovery rate of MNC（%）
Established cell line		
KG1a	78.9	
Fresh samples		
CD34⁺ ALL	38.5	111.5
CD34⁻ AL	9.3	108.6
NHL	58.2	101.4
Breast ca.	52.5	89.4
Healthy	9.3*	89.4*
Frozen samples		
ALL	3.9*	58.8*

MNC : mononuclear cell　ALL : acute lymphoblastic leukemia　* : median　NHL : non-Hodgkin's lymphoma
Recovery rate of CD34⁺ cells（%）: No. of CD34⁺ cells in adsorbed cells/No. of CD34⁺ cells in pretreated cells
Recovery rate of MNC（%）: (No. of MNC in adsorbed cells ＋No. of MNC in unadsorbed cells)/No. of MNC in pretreated cells

action（RT-PCR）法の至適 cycle 数の検討

RT-PCR 法[2)]の至適 cycle 数を決定するため Ph 陽性 ALL 検体からグアニジン法[3)]により total RNA を抽出し，種々の cycle 数で bcr-abl 遺伝子を増幅した．増幅産物は ethidium bromide で染色後，2%agarose gel に電気泳動し，densitometer で検出バンドを測定した．PCR に使用した primer は，諸家の報告[4)~7)]を参考に，DNA synthesizer にて合成した．primer の sequence を以下に記す．

ALL 5' bcr primer；GTT GTC GTG TCC GAG GCC AC

ALL 3' abl primer；GCT CAA AGT CAG ATG CTA CT

2）臨床検体における MRD の検出

Ph 陽性 CD34 抗原陰性 ALL 患者の第１寛解期に採取した骨髄液１検体（新鮮検体）を adsorbed cell 層，unadsorbed cell 層に分離し，各層から total-RNA を抽出した．上記で測定した至適 cycle 数で bcr-abl 遺伝子を増幅し，MRD の有無を検討した．

結　　果

1．CD34 陽性細胞の選択回収

KG1a および臨床検体を用いた結果を Table 2, 3 に示す．KG1a では pretreated cell（MNC 100.0 ×10⁶）中の CD34 陽性率は 8.4%（理論値 10.0%），処理後の adsorbed cell（MNC8.3×10⁶）中の CD 34 陽性細胞率（purity）は 79.9% であった．CD 34 陽性細胞の回収率は 78.9% で，高率に CD34 陽性細胞を選択回収できた．

患者から採取した新鮮検体４検体（ALL 2, NHL 1, 乳癌 1）における adsorbed cell 中の purity は中央値 53.5（7.8～97.1）%，CD34 陽性細胞の回収率は 45.5（9.3～58.2）%，MNC の回収率は 105.1（89.4～111.5）%であった．なお CD34⁺ALL １検体は，CD34 抗原陽性 ALL 症例の非寛解時に採取した検体であったため，処理前の CD34 陽性率は 72.5 %と高値を示した．

健常人から採取した新鮮検体４検体では，CD34 細胞の purity 61.9（56.8～81.7）%，MNC の回収率

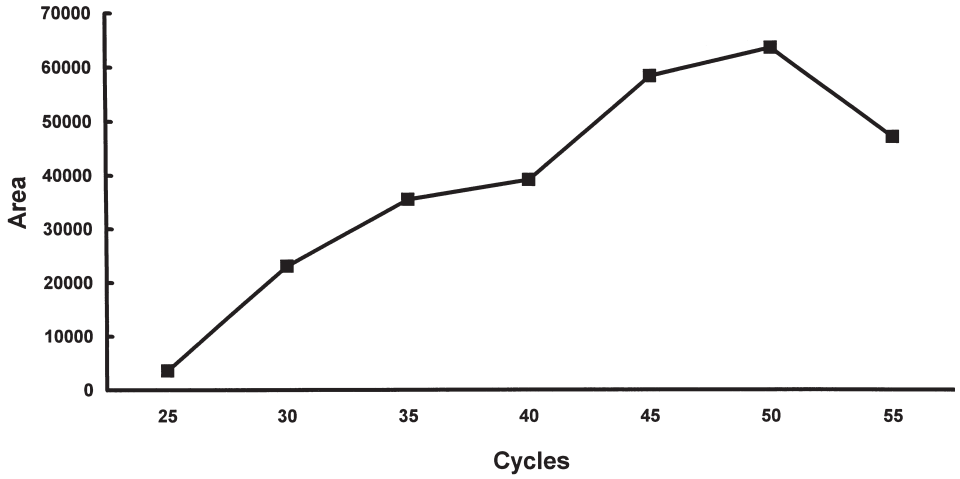


Fig. 2 Measurement of optimum no. of cycles for amplification of bcr-abl gene by PCR method. The bcr-abl gene obtained from Ph-positive ALL patients was amplified by various cycles and the products were subjected to 2%agarose gel. The product area was measured by densitometer. Over 50 cycles we observed degradation of DNA, and over 45 cycles non-specific bands were detected. Forty cycles was therefore selected.

89.4 (80.7～99.6) %と比べて，CD34 細胞の回収率は 9.3（5.8～14.5）%と低値であった．

凍結検体 3 検体（ALL 3）における CD34 細胞の purity は 52.3（27.6～58.2）%であったが，CD34 陽性細胞の回収率および MNC の回収率は 3.9（2.5～15.4）%，58.8（57.7～100.6）%と低値を示した．また凍結，解凍処理による死細胞率を trypan blue exclusion procedure で調べたところ，解凍後の細胞の viability は 94.3+/−2.2% であった．

2. PCR 法における至適 cycle 数

PCR 法における至適 cycle 数を検討した（Fig. 2）．50cycles 以上で DNA の degradation が起こり感度が低下し，45cycles 以上で非特異的な band が検出された．比較的直線的に上昇し，非特異的な band を認めなかった 40cycles を至適 cycle 数とした．また MRD の検出感度を dilution 法により検討したところ，10^{-4} レベルまで検出可能であった．

3. MRD の検出

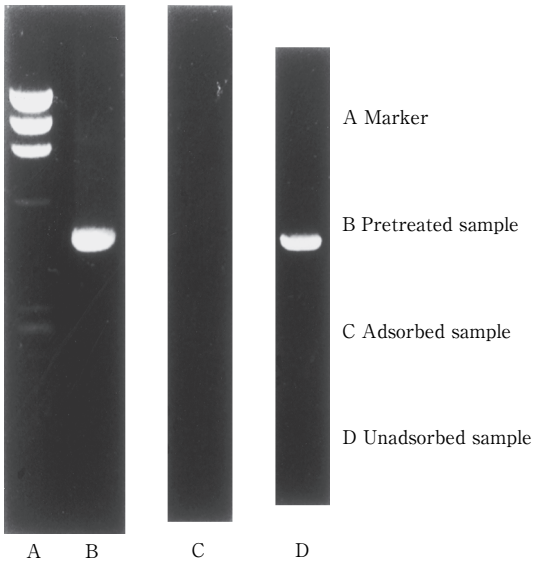
第 1 寛解期に採取した CD34 抗原陰性，bcr-abl 遺伝子再構成を認めた ALL 例 1 検体（新鮮検体）に対して MRD の検出を試みた．pretreated cell で認めた bcr-abl 遺伝子は，adsorbed cell 層では消失していた（Fig. 3）．

考　按

1. CD34 陽性細胞の選択回収

CEPRATE LC KIT®を用いて CD34 陽性細胞の選択回収を試みた．ABIA を用いた target cell の回収率は 45% 前後[8]，特に CD34 陽性細胞の回収率は 35.0～73.2% と報告されている[9)10)]．CD34 陽性ヒト白血病細胞株 KG1a における CD34 陽性細胞の回収率は 78.9% と良好で，ABIA による CD34 陽性細胞の選択回収は可能と考えられた．

患者から採取した新鮮検体（ALL，NHL，乳癌）でも，CD34 陽性細胞や MNC 細胞の回収率は 45.5%，105.0% と比較的良好で，患者新鮮検体からも CD34 陽性細胞の回収は可能と考えられた．しかし CD34 抗原陽性 ALL 1 検体では CD34 陽性細胞の回収率，MNC の回収率，吸着層での purity とも良好であったが，非吸着層の CD34 陽性細胞率も 65.0% と高値であった（Table 2, 3）．これは処理前の CD34 陽性細胞数（72.5%）に対して反応させた抗体量が不足していたためと考えられた．またこの検体を用いて MRD の検索を行ったとこ



Fig．3　Detection of minimal residual disease（MRD）from a separated Ph-positive ALL fresh sample by PCR method. Lane A shows marker, lane B showes result of detection of MRD from the pre-treated sample, from the adsorbed sample（lane C）and from the unadsorbed sample（lane D）. MRD was not detected in the adsorbed sample.

ろ回収層から腫瘍細胞が検出された（data not shown）．以上より CD34 抗原陽性の腫瘍系では効率的な CD34 陽性細胞の選択回収は困難と考えられた．また CD34 抗原陰性 ALL 1 検体では MNC の回収率は高値であったが，CD34 陽性細胞の回収率は 9.3% と低値を示した．しかし 31.5×10^6 の有核細胞から 0.3×10^6 の CD34 陽性細胞を回収できており（purity 25.6%），2.1×10^8/kg の骨髄有核細胞を採取すれば移植に必要な 2.0×10^6/kg の CD34 陽性細胞を集められ，本例は臨床応用可能と考えられた．乳癌検体では回収率は 52.5% と比較的良好であったものの吸着層での CD34 陽性率は 7.8% と低値であった．吸着層での CD34 陽性率が低いと非 CD34 細胞の混入，すなわち腫瘍細胞の混入率が高くなり，purging 効果が十分に得られない可能性がある．以上より新鮮患者検体から効率的に CD34 陽性細胞を選択回収するには，CD34 抗原陰性の腫瘍であること，吸着層の purity が高率であることが必要と考えられた．

健常人から採取した新鮮検体における MNC の回収率（中央値 89.4%）や CD34 細胞の purity（61.9%）は比較的良好であったが，CD34 陽性細胞の回収率は 9.3% と低値であった．吸着層と非吸着層の CD34 陽性細胞の和を処理前の CD34 陽性細胞数で割ってみると 74.2（54.5～92.1）%となり（新鮮患者検体では 100（90.9～100）%），約 1/4 の CD34 陽性細胞が loss されていたことになる．この loss の原因として，1）細胞処理中に脱落もしくは死活した可能性 2）カラム内に細胞が残存した可能性などが考えられた．同種骨髄移植において GvHD の発症を軽減する目的に，健常人ドナーから採取した造血細胞から CD34 陽性細胞を選択採取する試みがすでに臨床応用されている．ABIA を用いた健常人からの CD34 陽性細胞の選択回収について，今後さらに検討を重ねたいと思う．

凍結検体における CD34 陽性細胞の回収率や MNC の回収率は 3.9%，58.8% と低く，CD34 陽性細胞を十分に回収できなかった．この原因は検体処理中にフィブリン様物質（clumping）が析出され，この物質がカラム内に付着し細胞の流出を阻害したためと考えられた．clumping を予防するため，凍結検体の採取時および解凍直後に ACD 液を混和したが，clumping の析出を 100% 防ぐことはできなかった．Alcorn[10] らは，凍結された末梢血幹細胞採取液から CD34 陽性細胞を選択回収後増幅し，自家移植 source として用いたことを報告している．彼らは解凍後の検体に trisodium citrate を混和し clumping の析出を予防した．しかしすべて防ぐことは不可能で，析出された clumping の量が多いと CD34 陽性細胞の回収率が低下したと報告している．以上より凍結処理後の検体から十分な CD34 陽性細胞を得るためには，clumping の析出を可能な限り予防すること，また析出された clumping は慎重に除去し細胞の loss を最小限に抑えることが重要な点と考えられた．

CD34 陽性細胞を選択回収するには今回行った ABIA の他に immunomagnetic bead 法がよく用いられている．免疫ビーズ法では回収率が 50% 前後，purity は約 90% 以上と報告されている[11)12)]．今回検討した ABIA 法による回収結果を bead 法

と比べてみると，新鮮患者検体でのCD34細胞の回収率はほぼ同等であったが，吸着層でのpurityがかなり低値であった．諸家の報告でもABIA法によるCD34陽性細胞のpurityは60%程度とされており[13]，immunomagnetic bead法と比べ低い可能性がある．一方今回CEPRATE LC KITで使用したCD34抗体（clone 12.8；CellPro）とフローサイトメトリーで使用したCD34抗体（HPCA-2, clone 8G12；オーソ社）の間に特異性の相違があり，それがpurityを下げた可能性も否定できない．今後ABIA法とbead法によるCD34陽性細胞の採取効率を比較検討し，同時に抗CD34抗体の特異性に関する検討も必要と思われた．

2. MRDの検出

CD34陽性細胞の選択回収による腫瘍細胞の除去率は4logs程度[14]といわれている．今回われわれは第1寛解期に採取したPh陽性ALL 1新鮮検体を使用し，選択回収後RT-PCR法によるbcr-abl遺伝子の検出を試みた．adsorbed cellからMRDが検出されず，この検体は選択回収を行うことによりpurging効果を得た可能性があった．しかし採取検体内の腫瘍細胞数が多いとadsorbed cellからMRDが検出される可能性が高くなる．今後定量的手法を用いてpurging効果の限界について検討する必要があると考えられた．

文　献

1) Brenner MK, et al.：Gene-marking to trace origin of relapse after autologous bone-marrow transplantation, Lancet, 341：85—86, 1993.
2) Kawasaki ES, et al.：Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro, Proc Natl Acad Sci USA, 85：5698—5702, 1988.
3) Chomczynski P, Sacchi N：Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, Anal Biochem, 162：156—159, 1987.
4) Fainstein E, et al.：A new fused transcript in Philadelphia chromosome positive acute lymphocytic leukemia, Nature, 330：386—388, 1987.
5) Clark SS, et al.：Expression of a distinctive bcr-abl oncogene in Ph[1]-positive acute lymphocytic leukemia（ALL），Science, 239：775—777, 1988.
6) Hermans A, et al.：Unique fusion of bcr and c-abl genes in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia, Cell, 51：33—40, 1987.
7) Miyamura K, et al.：Detection of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia by polymerase chain reaction：Possible eradication of minimal residual disease by marrow transplantation, Blood, 79：1366—1370, 1992.
8) Berenson RJ, et al.：Positive selection of viable cell populations using avidin-biotin immunoadsorption, J Immunol Methods, 91：11—19, 1986.
9) Silvestri F, et al.：Positive selection of CD34$^+$ cells：A short review of the immunoadsorption methods currently available for experimental and clinical use, J Hematother, 2：473—481, 1993.
10) Alcorn MJ, et al.：CD34-positive cells isolated from cryopreserved peripheral-blood progenitor cells can be expanded ex vivo and used for transplantation with little or no toxicity, J Clin Oncol, 14：1839—1847, 1996.
11) Abonour R, et al.：Autologous transplantation of mobilized peripheral blood CD34$^+$ cells selected by immunomagnetic procedures in patients with multiple myeloma, Bone Marrow Transplant, 22：957—963, 1998.
12) Mapara MY, et al.：Combined positive/negative purging and transplantation of peripheral blood progenitor cell autografts in breast cancer patients：a pilot study, Exp Hematol, 27：169—175, 1999.
13) Bensinger WI, et al.：Transplantation of allogeneic CD34$^+$ peripheral blood stem cells in patients with advanced hematologic malignancy, Blood, 88：4132—4138, 1996
14) Colter M, et al.：CD34$^+$ progenitor cell selection：clinical transplantation, tumor cell purging, gene therapy, ex vivo expansion, and cord blood processing, J Hematother, 5：179—184, 1996