

原 著

臍帯血の CD34 陽性細胞数の測定における CD34-SSC 法と ProCOUNT 法の比較

芹澤 領¹⁾ 安武 幹智¹⁾ 斎藤 健一¹⁾
徐 岩文¹⁾ 竹内 久彌²⁾ 高橋 恒夫¹⁾

¹⁾ 東京大学医科学研究所細胞プロセッシング研究部門

²⁾ 順天堂大学医学部付属順天堂浦安病院産婦人科

(平成 9 年 8 月 25 日受付)

(平成 11 年 8 月 19 日受理)

COMPARISON of CD34-SSC AND ProCOUNT METHODS IN COUNTING CD34-POSITIVE CELLS IN CORD BLOOD

R. Serizawa¹⁾, M. Yasutake¹⁾, K. Saito¹⁾, Y. Xu¹⁾,
H. Takeuchi²⁾ and T. A. Takahashi¹⁾

¹⁾ Department of Cell Processing, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

²⁾ Juntendo Urayasu Hospital, Juntendo University School of Medicine

It is important to obtain an accurate progenitor cell count for estimating the safety and efficiency of cord blood transplantation. Several methods enumerating CD34+ stem and progenitor cells by flow cytometry (FCM) have been reported. In order to estimate the accuracy of these methods, we compared two flow cytometric methods that enumerate absolute CD34+ cell count in cord blood.

Forty-one cord blood samples were evaluated by the CD34-SSC and ProCOUNT methods. CD 34-SSC and ProCOUNT gave 15.7 ± 9.6 CD34+ cells/ μ l and 20.9 ± 10.1 CD34+ cells/ μ l (mean $\pm$ 1S. D.) in whole cord blood, respectively. In correlation between colony forming units (CFU) and the CD34 + cell count, both methods gave significant correlation coefficient values. The coefficient of variation (CV) in CD34+ cell count by the CD34-SSC method averaged 25.0%, whereas that of ProCOUNT averaged 12.7% (n=8). A statistical difference in CV values was observed between the two methods (p < 0.05). These results indicate that the ProCOUNT method can give more reliable results than the CD34-SSC method.

Key words : CD34+ cells, flow cytometry, cord blood, ProCOUNT, hematopoietic stem cells

はじめに

臍帯血を用いた造血幹細胞移植（臍帯血幹細胞移植）が近年急速に進められつつある^{1)~5)}。臍帯血幹細胞移植の安全性および有効性を評価するために移植造血前駆細胞数の正確かつ再現性のよい測定方法を確立することが必要である。CD34 モノ

クローナル抗体を用いたフローサイトメトリー（flow cytometry : FCM）法によって算出される CD34 陽性細胞数による造血前駆細胞数測定法⁶⁾はコロニーアッセイに比べて迅速かつ簡便な点が利点である。しかし、臍帯血に含まれる CD34 陽性細胞数は骨髓、顆粒球コロニー刺激因子（granu-

locyte colony stimulating factor : G-CSF) を投与した末梢血に比較して少量であり, FCM 法による検出を難しくしている^{7)~9)}. また FCM 法より得られる CD34 陽性細胞数は測定法によって差が見られ⁷⁾¹⁰⁾, 測定法の確立は移植単位の有効性を評価する上で重要な課題となっている.

そこで我々は臍帯血中の CD34 陽性細胞測定法として, 従来法, 即ち CD34 と側方散乱光 (side scatter : SSC) を用いる CD34-SSC 法⁶⁾と, 最近開発された ProCOUNT 法^{11)~13)}との比較検討を行った. その結果 ProCOUNT 法は規格化された測定システムであり操作が簡便であった. コロニー形成細胞数との相関において, 2 法とも有意な相関関係を得ることができた. さらに同時測定再現性を比較した結果, ProCOUNT 法の方がより再現性の高い値を得ることができ, 臍帯血中の CD34 陽性細胞の測定法として有用であるという結果を得たので報告する.

材料および方法

1. 臍帯血の採取

母親からインフォームドコンセントが得られた正常妊娠分娩の正期産例を試験の対象とした. 胎盤娩出後に胎盤を保持具 (テルモ, 東京) に吊し, 十分消毒した臍帯静脈から 18G 針で抗凝固剤 CPD (citrate phosphate dextrose) 28ml 入血液バッグ (ニプロ, 大阪) に採血した¹⁴⁾. 採血後 24 時間以内に各種測定を行った.

2. フローサイトメトリー解析

CD34-SSC 法と ProCOUNT 法の特徴を Table 1 にまとめた. ProCOUNT 法で新しく採用してい

る手法は, CD45 抗体, 内部標準ビーズ, DNA Dye の使用の 3 点である. DNA Dye は DNA/RNA を特異的に染色し, 有核赤血球を含む全有核細胞を検出することのできる核染色剤である¹³⁾. ProCOUNT 法は CD34 陽性細胞数と同時に内部標準ビーズ数を計測し測定した検体量を求め, 解析時に絶対数を求める原理を採用している. したがって自動血球計算機による血算値の算出を行わずに単位体積あたりの CD34 陽性細胞数の算出を可能にしている.

2.1. CD34-SSC 法

臍帯血 100 μ l に CD34 抗体 (8G12-FITC Becton Dickinson : BD 社, San Jose, CA) またはコントロール抗体 (IgG1-FITC, BD 社) 10 μ l を加えた. 暗所氷温にて 30 分間反応させた後, 1.4ml の 0.85 % 塩化アンモニウム溶液 (pH7.4) を加え 10 分間室温にて溶血させ, 遠心分離後 2% (v/v) 牛胎児血清 (fetal calf serum : FCS) 0.02% (v/v) エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediamine-tetraacetic acid disodium salt : EDTA) を含む磷酸緩衝生理食塩水 (2%FCS, 0.02%EDTA/PBS) で洗浄した. さらに 20 μ g/ml プロピディウムイオダイド (propidium iodide : PI) を含む 2%FCS, 0.02% EDTA/PBS に懸濁し, フローサイトメーター (FACS Calibur, BD 社) で解析した. 1 回の測定につき合計 60,000 個の細胞を取り込んだ.

ゲートの設定は Siena et al.⁶⁾の方法に従い, 最初に全ての細胞群を前方散乱光—側方散乱光 (FSC-SSC) ドットプロット (Fig. 1-A), および PI-FL 3 ヒストグラム (Fig. 1-B) にて表示した. FSC-SSC ドットプロット上のリンパ球 (R1), 単球 (R2), 顆粒球 (R3) にゲートを設定し白血球群とし, PI-FL3 ヒストグラム上の PI 非染色細胞を生細胞群としてゲート (R4) をかけた. つぎに白血球群 (R1, R2, R3) と生細胞群 (R4) のゲートを共に満たす細胞群を測定対象細胞の母集団とし, SSC-CD34 ドットプロットにて展開し (Fig. 1-C), CD 34 陽性かつリンパ球, 単球と同等の低 SSC の細胞を CD34 陽性細胞群 (R5) とした. フローサイトメトリー解析により求めた CD34 陽性細胞率に自動血球計算器 (Coulter Microdiff 16, Coulter

Table 1 Summary of characteristic features of the ProCOUNT and CD34-SSC methods

	CD34-SSC	ProCOUNT
Antibody Used	CD34-FITC (8G12)	CD34-PE (8G12) CD45-PerCP
Use of internal standard	No	Yes
Threshold Reagent (DNA Dye)	No	Yes
Washing step	2 times	No
Use of hematology analyzer	Yes	No

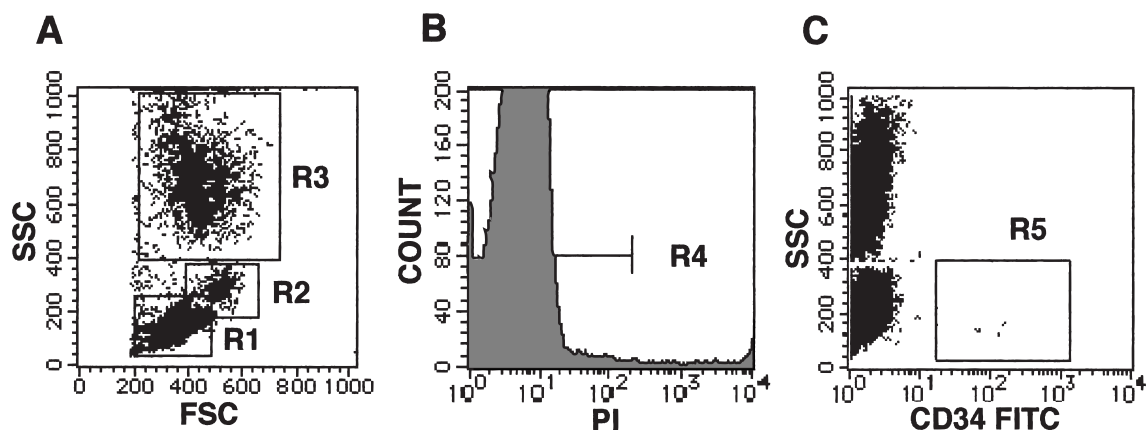


Fig. 1 Typical plots by the CD34-SSC method. A : FSC vs SSC plot. B : PI-FL3 histogram. C : CD34-FITC vs SSC. R1 : lymphocytes. R2 : monocytes. R3 : granulocytes. R4 : PI negative cells (live cells). R5 : CD34 positive cells.

Electronics, Hialeah, FL)で得られた血算値を乗じ、臍帯血 1 μ l 当たりの CD34 陽性細胞数を算出した。

2.2. ProCOUNT 法

臍帯血 50 μ l に ProCOUNT コントロール試薬および CD34 試薬 (BD 社) 20 μ l を添加し、内部標準ビーズを含んだ試験管 (TruCOUNT チューブ, BD 社) 中で室温 15 分間暗所で反応させた。さらに 450 μ l の FACS 溶血試薬 (BD 社) を加え室温 30 分間暗所で反応させた。反応後ただちに FACS Calibur で解析を行った。フローサイトメーターの蛍光強度増幅率の調整は Calibrite Beads (BD 社) を用い、機器設定ソフトウェア FACS Comp 2.0 (BD 社) の LNW (Lysing No Wash) モードにて行った。1 回の測定につき、合計 60,000 個の細胞を取り込んだ。

ProCOUNT 法でのゲート設定は報告されている方法に従った¹²⁾¹³⁾。全ての細胞群を SSC-DNA Dye ドットプロット (Fig. 2-A), および SSC-CD 45 ドットプロット (Fig. 2-B) にて展開した。SSC-DNA Dye プロット上のリンパ球群と単球群にゲート R1 (Fig. 2-A) を設定した。SSC-CD45 ドットプロット上に認められるリンパ球群 (CD45 弱陽性低 SSC : 0~200) 単球群 (CD45 弱陽性弱 SSC : 200~400) 群 (R1) の CD45 弱陽性領域を含み、およびデブリス群 (CD45 弱陽性) の CD45

陰性領域を排除するようにゲート R2 (Fig. 2-B) を設定した。CD45 弱陽性領域ゲートの右端の設定はリンパ球群の CD45 強陽性分画 (R5) を排除するように行い、左端の設定は CD45 弱陽性細胞のクラスターを含むように陰性部分にも重なるように設定した。つぎに R1 と R2 のゲートを共に満たす細胞群を Mouse IgG1-DNA Dye および CD34-DNA Dye ドットプロット (Fig. 2-C, D) に展開した。Fig. 2-D に認められる CD34 陽性細胞を含むようにゲート R3 を設定した。Isotype コントロールである Mouse IgG1-DNA Dye ドットプロットを Fig. 2-C に示した。R1, R2, R3 の全てのゲートを満たす細胞を CD34 陽性細胞とした。R4 に含まれる内部標準ビーズの数と CD34 陽性細胞数の比、そして単位血液量 (50 μ l) に添加した内部標準ビーズ数の比から臍帯血 1 μ l 当たりの CD34 陽性細胞数を算出した。

3. 同一サンプルでの再現性の比較

同一臍帯血 8 検体を 2 法にて 10 回繰り返し測定を行い、得られた平均値と標準偏差より変動係数を求め比較した。

4. コロニーアッセイ

5 μ l の臍帯血をメチルセルロース培地 (Methocult GF H4434V, StemCell Technologies Inc., Vancouver, Canada) 2.5ml に植えた。これらをよく混和した後 35 $\times$ 10mm プラスチック

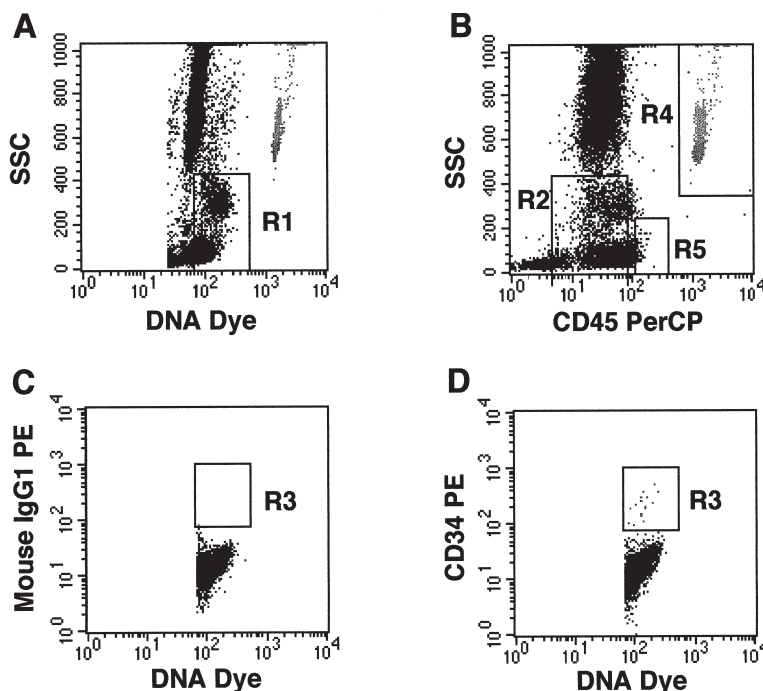


Fig. 2 Typical plots by the ProCOUNT method. A : DNA dye vs SSC plot. B : CD 45 PerCP vs SSC plot. C, D : DNA dye vs CD34 plot. R1 : lymphocytes and monocytes. R2 : CD45 dim and low SSC cells. R3 : CD34-positive and DNA dye-positive cells. R4 : Internal standard beads. R5 : CD45 bright cells.

ディッシュに 1ml のメチルセルロース培地を分注し、37℃、5%CO₂ 存在下にて培養した。14 日後に顆粒球マクロファージコロニー形成細胞 (CFU-GM)、赤芽球バースト形成細胞 (BFU-E)、混合コロニー形成細胞 (CFU-Mix) のそれぞれから形成されたコロニーを検鏡し同定した。すべてのコロニー数の総和を colony-forming-units 数 (CFU 数) とした。

5. 統計処理

相関係数の差の検定には z 変換による検定法を用い $p < 0.05$ を有意とした。単回帰分析より得られた回帰係数は $p < 0.01$ を有意とした。単回帰分析より得られた回帰係数は $p < 0.01$ を有意とした。2 法による変動係数の差の検定には対応のある t 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

結 果

1. 操作性の比較

ProCOUNT 法と CD34-SSC 法の操作性を比較

した。ProCOUNT 法は溶血後の遠心および洗浄操作が省かれている点が簡便であった (Table 1)。1 検体の染色処理にかかった時間は CD34-SSC 法で 45 分、ProCOUNT 法で 50 分と両法に大きな差は認められなかった。

2. CD34 陽性細胞数の比較

同一臍帯血 41 検体の臍帯血 1μl 当たりの CD 34 陽性細胞数を CD34-SSC 法および ProCOUNT 法により測定した。CD34 陽性細胞数の平均値は CD34-SSC 法、ProCOUNT 法にてそれぞれ 15.7 ± 9.6 cells/μl, 20.9 ± 10.1 cells/μl (平均 $\pm$ 1S. D., $n=41$) であった。CD34 陽性細胞として取り込んだ細胞数の範囲は CD34-SSC 法にて 12 個から 271 個であり、中央値は 86 個であった。同じく ProCOUNT 法では 30 個から 284 個であり、中央値は 95 個であった。2 法により得られた CD34 陽性細胞数の相関を検討したところ、相関係数 $r=0.390$, $p < 0.05$ と相関関係が認められた (Fig. 3)。

3. CD34 陽性細胞数と CFU 数との相関関係

2 法のうちどちらが正確に造血前駆細胞数を反映するかさらに検討する目的で、2 法により得られた CD34 陽性細胞数と CFU 数との間の相関を比較した。CD34 陽性細胞数と CFU 数との相関係数は CD34-SSC 法, ProCOUNT 法にて各々 $r=0.405$, $p<0.01$ (Fig. 4-A), $r=0.614$, $p<0.0001$ (Fig. 4-B)であった。両者の相関係数の差を比較したところ $p=0.215$ と有意な差は認められなかった。

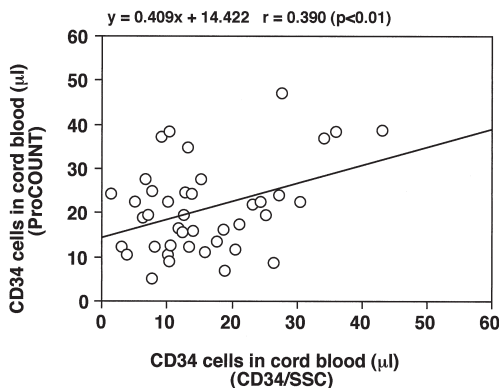


Fig. 3 Comparison of CD34+ cell counts between the ProCOUNT and CD34-SSC methods. There was a positive correlation between the two methods ($r=0.390$).

4. 同一サンプルでの再現性の比較

CD34-SSC 法および ProCOUNT 法により得られた臍帯血 8 検体の変動係数と CD34 陽性細胞数との関連を Fig. 5 に示した。2 群間の変動係数の差を比較したところ, $p<0.05$ と有意な差が認められた。

考 察

FCM 解析における CD34 陽性細胞数の測定は造血前駆細胞の測定法として、迅速かつ簡便である点が有用である⁶⁾¹¹⁾¹³⁾。しかしながら、多施設比較試験の結果は施設による測定値に差が生ずる可能性を指摘している⁷⁾⁸⁾。近年急速に進みつつある臍帯血幹細胞移植^{1)~5)}においても移植造血前駆細胞の正確かつ再現性のよい測定方法を確立することが必要であると考えられる。

最近開発された ProCOUNT 法は内部標準をキットに含む 1 プラットフォームアッセイであり^{11)~13)}。CD34 陽性細胞測定法として有用であると報告されている¹²⁾¹³⁾。そこで我々は臍帯血の CD34 陽性細胞測定法として、従来法としての CD34-SSC 法と ProCOUNT 法との比較検討を行った。臍帯血 41 検体の CD34 陽性細胞数を測定した結果、2 法ともに CFU 数と良好な相関性を示した (Fig. 4)。さらに同時測定再現性の検討を行った結

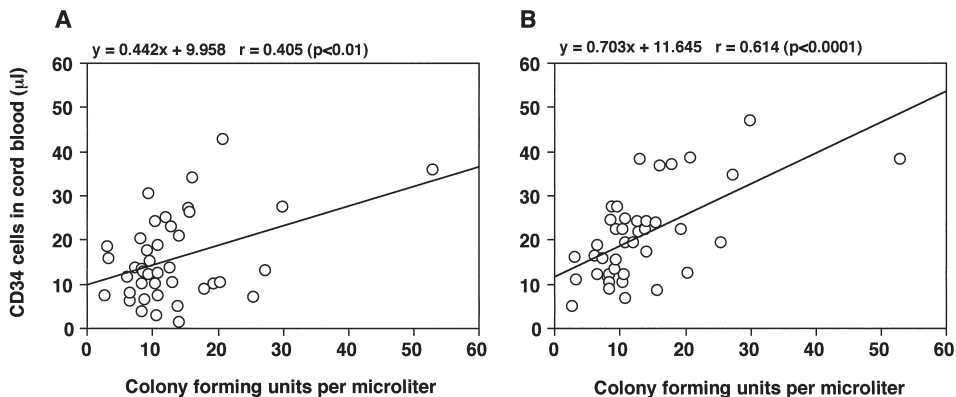


Fig. 4 Comparison of CD34+ cell counts and the number of day 14 CFUs. (A) Correlation of CD34+ cell counts by the CD34-SSC methods to the number of day 14 CFUs. Linear regression analysis demonstrated a positive correlation between CD34+ cells and total CFUs ($r=0.405$). (B) Correlation of CD34+ cell counts by the ProCOUNT method to the number of day 14 CFUs. Linear regression analysis demonstrated a positive correlation between CD34+ cells and total CFUs ($r=0.614$).

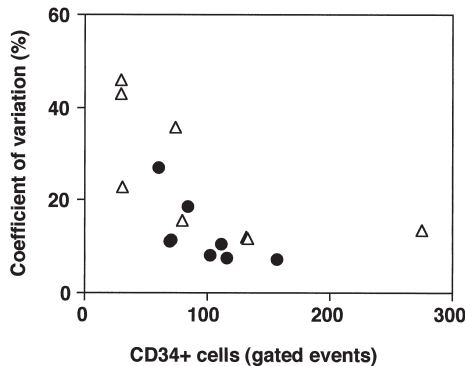


Fig. 5 Correlation of the coefficient of variation to the number of CD34+ events in the sample analyzed. Data from 10 determinations on 8 cord bloods. ProCOUNT and CD34-SSC methods were compared. ●, ProCOUNT, △CD34-SSC method.

果、従来法に比較して、ProCOUNT法は有意に高い ($p < 0.05$) 再現性を示した (Fig. 5)。

FCM解析においてしばしば抗体の非特異吸着による偽陽性細胞の存在が問題となる。成熟したリンパ球、顆粒球、単球に対し非特異的にCD34抗体が反応することがある。これらの非特異吸着の原因となる細胞群の中で成熟したリンパ球はCD45強陽性¹⁵⁾であるが、これに対し造血前駆細胞はCD45弱陽性¹⁶⁾の特徴を示す。したがってCD45抗体を用いれば成熟したリンパ球に対する非特異吸着に起因する偽陽性細胞は排除できる。ProCOUNT法ではCD45抗体を用い、R5のゲートに含まれる成熟したリンパ球に対する非特異吸着による偽陽性細胞、およびCD45陰性のデブリスに起因する偽陽性細胞を排除してCD34陽性細胞を検出している¹¹⁾¹²⁾ (Fig. 2)。さらにProCOUNT法では有核細胞染色試薬であるDNA Dyeを用いて有核細胞を染色し、CD34陽性、低SSC、CD45弱陽性に加えDNA Dye陽性である細胞を造血前駆細胞であると認識しゲートの設定をより厳密にしている。

従来法にないProCOUNT法で採用している3番目の方法として内部標準ビーズの使用があげられる (Table 1)。内部標準の使用により得られるメリットとして、自動血球計算機の使用の省略と洗浄操作による細胞損失の回避がある¹²⁾¹³⁾。従来法

では測定対象細胞数に対するCD34陽性細胞の割合に血算値を乗じCD34陽性細胞数を求める2プラットフォームアッセイ¹³⁾であるが、この方法では血算値および洗浄時の細胞損失に起因する測定誤差が生ずる可能性が指摘されている¹³⁾。

従来法のような2プラットフォームアッセイでは、測定対象細胞として独立した2群の母集団を設定している。すなわちFCM解析におけるFSC-SSCドットプロットとして認識される有核細胞群 (Fig. 1)、および自動血球計算器で得られる血算値である。臍帯血に多量に含まれる赤芽球は、2プラットフォームアッセイにて生ずる測定誤差の発生要因となることが考えられる¹³⁾。赤芽球は有核であり、リンパ球とSSCの強度が変わらないものも含まれる¹⁷⁾¹⁸⁾。臍帯血中に含まれる赤芽球の割合は溶血処理の方法により大きく異なり、有核細胞群への混入率は25~71%と非常に大きい¹⁰⁾。FCM測定時と血算測定時の溶血処理は異なり、両方で独立に認識される有核細胞群に含まれる赤芽球の割合を同一であると保証することはできない。

一方、溶血後の洗浄操作時に白血球成分が失われる可能性も指摘されている¹⁹⁾。FritschらはCD34陽性細胞数測定において洗浄操作時に細胞損失が認められることを報告した¹⁹⁾。またMenendezらは溶血洗浄処理が一部のCD34陽性細胞損失の原因である可能性を示唆した²⁰⁾。したがって従来法では洗浄操作時に一部の細胞が損失する恐れがあることが考えられる。以上より従来法においては2プラットフォームアッセイに由来する測定誤差が生ずることが懸念される。

これに対しProCOUNT法では内部標準を用いることで血算値を用いることなくかつ、洗浄操作を省いてCD34陽性細胞数の算出を可能にしており、2プラットフォームアッセイに由来する測定誤差を考慮する必要はない。従来法で採用していない方法、すなわちCD45抗体および有核細胞染色試薬の使用、さらに内部標準の採用による1プラットフォームの測定、以上3点の手法が同時測定再現性の向上に寄与したと考えられる。我々の試験では2法の比較試験を行うため、両法の取り

込み細胞数を60000個に制限した。FCMの測定値の再現性は取り込み細胞数を多くすることでも向上させることができる¹²⁾。従来法においても取り込み細胞数を多くすることで、さらなる再現性の向上は可能であろう。

ProCOUNT法は末梢血CD34陽性細胞数を測定するために規格化されたものであり¹²⁾、臍帯血のCD34陽性細胞測定法としては必ずしも確立された測定法ではない。臍帯血をProCOUNT法にて全血のまま測定する場合、FCMのドットプロット上にてCD34陽性細胞がクラスターを形成しない場合がほとんどであり、CD34陽性細胞とそれ以外の細胞集団との境界が明瞭ではないためゲートの設定が難しい。我々はFig.2に示すようなゲート設定のテンプレートをを用いた。一度テンプレートを設定しておけば、繰り返しの解析が可能になり解析に要する時間を短縮でき、かつ検体によるゲート設定の修正が簡単になる。しかしながら、ゲート設定に修正の余地があることは、測定結果に個人差が生じてしまう可能性も生ずる。施設間の測定値に差が生じている原因の一つとして、ゲート設定の差による可能性も指摘されている²¹⁾。今後FCM法によるCD34陽性細胞測定法の標準化を進めていく上で、ゲート設定の差による測定値の変動を小さくするための施策が必要であろう。

結 語

1. ProCOUNT法は規格化されたCD34陽性細胞の測定システムであり、CD34陽性細胞数測定法として有用であると考えられた。

2. 臍帯血全血中のCFU数とCD34陽性細胞数の相関において、従来法およびProCOUNT法は共に有意な相関関係を得ることができた。

3. 従来法に比較してProCOUNT法は有意に高い再現性を示し、従来法に比較してより信頼性の高い値を得ることができると考えられた。

文 献

1) Gluckman, E., Broxmeyer, H.E., Auerbach, A.D., et al.: Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. *N. Engl. J.*

Med., 321: 1174—1178, 1989.

2) Kurtzberg, J., Laughlin, M., Graham, M.L., et al.: Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N. Engl. J. Med.*, 335: 157—166, 1996.

3) Wagner, J.E., Rosenthal, J., Sweetman, R., et al.: Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease. *Blood*, 88: 795—802, 1996.

4) 西平浩一: 臍帯血幹細胞移植. *日輸血会誌*, 42: 145—151, 1996.

5) 服部金哉, 矢部晋正, 矢部みはる, 他: 臍帯血幹細胞移植を施行した急性白血病(M1). *臨床血液*, 37: 1371—1376, 1996.

6) Siena, S., Bregni, M., Brando, B., et al.: Flow cytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients. *Blood*, 77: 400—409, 1991.

7) Brecher, M.E., Sims, L., Schmitz, J., et al.: North American multicenter study on flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem cells. *J. Hematotherapy*, 5: 227—236, 1996.

8) Knape, C.C.: Standardization of absolute CD34 cell enumeration. *J. Hematotherapy*, 5: 211—212, 1996.

9) Fritsch, G., Emminger, W., Buchinger, P., et al.: CD34-positive cell proportions in peripheral blood correlate with colony-forming capacity. *Exp. Hematol.*, 19: 1079—1083, 1991.

10) Nicol, A.J., Denning—Kendall, P.A., Donaldson, C., et al.: An improved method of CD34+ cell quantitation from umbilical cord blood. *Blood*, 84 (Suppl. 1): 103[abtr], 1994.

11) Chen, C.H., Lin, W., Shye, S., et al.: Automated enumeration of CD34+ cells in peripheral blood and bone marrow. *J. Hematotherapy*, 3: 3—13, 1994.

12) Ward, T., Greiner, K., Knape, C., et al.: ProCOUNT: Setting the standard for progenitor cell enumeration. Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, 1997.

13) Gratama, J.W., Orfao, A., Barnett, D., et al.: Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Cytometry*, 34: 128—142, 1998.

14) 平成8年度厚生省骨髓移植調査研究事業B班, 班長浅野茂隆: 臍帯血プロセッシングと移植の適応に関する自主ガイドライン (日本語版) 1997.

15) Terstappen, L.W. M.M. and Levin, J.: Bone mar-

- row cell differential counts obtained by multidimensional flow cytometry. *Blood Cells*, 18 : 311—330, 1992.
- 16) Lansdop, P.M., Sutherland, H.J. and Eaves, C.J. : Selective expression of CD45 isoforms on functional subpopulations of CD34+ hemopoietic cells from human bone marrow. *J. Exp. Med.*, 172 : 363—366, 1990.
- 17) Han, P., Hodge, G., Story, C., et al. : Phenotype analysis of functional T-lymphocyte subtypes and natural killer cells in human cord blood : relevance to umbilical cord blood transplantation. *Brit. J. Haematol.*, 89 : 733—740, 1995.
- 18) Little, M.T., Langlois, S., Wilson, R.D., et al. : Frequency of fetal cells in sorted subpopulation of nucleated erythroid and CD34+ hematopoietic progenitor cells from maternal peripheral blood. *Blood*, 89 : 2347—2358, 1997.
- 19) Fritsch, G., Printz, D., Stimpfl, M.N., et al. : Quantification of CD34+ cells : comparison of methods. *Transfusion*, 37 : 775—784, 1997.
- 20) Menendez, P., Redondo, O., Rodriguez, A., et al. : Comparison between a lyse-and-then-wash method and a lyse-non-wash technique for the enumeration of CD 34 + hematopoietic progenitor cells. *Cytometry*, 34 : 264—271, 1998.
- 21) Chang, A. and Ma, D.D. F. : The influence of flow cytometric gating strategy on the standardization of CD34+ cell quantitation : An Australian multicenter study. *J. Hematotherapy*, 5 : 605—616, 1996.
-