

原 著

多項目自動血球分析装置 SE-9000 の IMI チャンネルを用いた 造血幹細胞測定条件の検討

野村 努¹⁾ 窪田 良次¹⁾ 馬場 夏美¹⁾
西郷 勝康²⁾ 田港 朝彦¹⁾

¹⁾香川医科大学附属病院輸血部

²⁾神戸大学病院輸血部

(平成 12 年 9 月 22 日受付)

(平成 13 年 4 月 26 日受理)

EVALUATION OF THE OPTIMAL CONDITION OF BLOOD SAMPLING APPLIED TO THE IMI
(IMMATURE INFORMATION) SCATTERGRAM OF THE AUTOMATED HEMATOLOGY
ANALYZER SE-9000

Tsutomu Nomura¹⁾, Yoshitsugu Kubota¹⁾, Natsumi Baba¹⁾,
Katsuyasu Saigo²⁾ and Tomohiko Taminato¹⁾

¹⁾Department of Transfusion Medicine, Kagawa Medical University Hospital

²⁾Blood Transfusion Division, Kobe University Hospital

To determine the optimal condition of blood samples applied to the stem cell monitor program of the automated hematology analyzer, SE-9000, we examined the effects of anticoagulants, temperature and duration of storage regarding samples on immature information (IMI) and hematopoietic progenitor cell (HPC) counts, which were obtained from the IMI scatter gram of the analyzer.

IMI and HPC cell counts were stable when EDTA-2K was used as an anticoagulant for blood sampling and the samples were kept at room temperature which was approximately 37°C. However, IMI and HPC cell counts should be measured within 4 hours after blood sampling, even in optimal conditions. Concerning those samples kept in the conditions as described above, reproducibility of IMI and HPC cell counts was good in general, although coefficients of variation were higher at low count levels of HPC cells (HPC cell < 40/μl). IMI and HPC cell counts significantly correlated with CD34-positive cell count in peripheral blood ($r = 0.738$ and 0.798 , respectively). In addition, HPC cell count in the apheresis products correlated with CD34-positive cell count and CFU-GM count in the products ($r = 0.620$ and $r = 0.691$, respectively). These findings indicate that IMI and HPC cell counts function as a predictor useful to determine the optimal harvest time of hematopoietic progenitor cells in peripheral blood, when the samples are maintained in an appropriate condition until counting can be performed.

Key words : IMI (immature information) channel, PBSCH (peripheral blood stem cell harvest), CFU-GM (colony forming units-granulocyte macrophage), CD34, HPC (hematopoietic progenitor cell)

はじめに

末梢血幹細胞移植療法 (PBSCT) が、各種疾患患者に施行され良好な治療成績が得られている。しかし、移植に必要な末梢血幹細胞の採取時期の決定は、必ずしも容易ではない。最近では、CD34 陽性細胞数を指標にすることが一般的であるが、測定費用が高く、測定時間が長いなどの問題があり、新しい指標が望まれていた。近年、自動血球分析装置の発展により幼若細胞を高感度に測定することが可能となり^{1,2)}、末梢血幹細胞採取時期決定に、多項目自動血球分析装置 SE-9000 (東亜医用電子株式会社) で測定される IMI (immature informatio) 及び HPC (hematopoietic progenitor cell) 細胞の測定値が有用であるとの報告がなされてきた³⁾⁻⁸⁾。しかし、検体の採血条件や保存条件、測定値の再現性などについては、殆ど検討されていない。そこで今回我々は、測定値の信頼性とその条件について若干の検討を行ったので報告する。

対 象

1998 年 11 月から 1999 年 5 月に、当院で化学療法を受けた悪性腫瘍患者 7 例に対して施行した末梢血幹細胞採取 (のべ 39 回) を対象として検討した。内訳は、悪性リンパ腫 3 例、急性骨髄性白血病 1 例、多発性骨髄腫 1 例および卵巣癌 2 例である。年齢は 23 歳 ~ 57 歳 (平均 40 歳)、男性 4 例、女性 3 例である。1 コースの化学療法に対して 2 ~ 4 回の末梢血幹細胞採取を行った。

方 法

1) 造血幹細胞採取

抗腫瘍剤投与後、G-CSF 投与を行い末梢血中に造血幹細胞を動員した。造血幹細胞の採取は、連続血液成分分離装置 COBE SPECTRA (Gambro 社) を用いて、150 ~ 200ml/kg の血液を処理した。

2) IMI 及び HPC の測定原理

細胞溶解剤 (STOROMATOLYSER-IM: 血球の細胞質及び細胞膜を固定化するためのポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤や含硫アミノ酸のほか、血球の細胞膜に損傷を与え、赤血球ゴーストと血小板を縮小化するための陰イオン性界面活性剤などが含まれている) を用いて検体を処理

する。この処理により成熟細胞や赤血球は溶解されゴーストとなる。残った未熟白血球を、多項目自動血球分析装置 SE-9000 (東亜医用電子社) の IMI channel を用いて、radio frequency (RF)/direct current (DC) 法にて 2 次元に展開する。RF は、顆粒などの細胞内情報により、DC は、細胞のサイズにより細胞集団を分類する。このため、未熟な細胞ほど IMI スキャタグラム上では下方に展開されることになる。IMI スキャタグラム上に出現する未熟細胞全体を「IMI 細胞」、このうち特に CD34 陽性細胞が検出されやすい下方領域の幹細胞検出領域の細胞を「HPC 細胞」として測定する (図 1)。

3) 抗 CD34-FITC (Becton Dickinson 社) と抗 CD45-PerCP (Becton Dickinson 社) を用いて、CD45 blast gating 法で CD34 陽性細胞を測定した⁹⁾。測定には、EPICS XL (Beckman Coulter 社) を用いた。

4) CFU-GM 数の測定

末梢血単核球を 1×10^5 /ml 並びに 2×10^4 /ml の細胞数になるようにメチルセルロース培地 (MethoCult Hcc-4444V: Veritas) に加え、35mm シャーレに 1ml 毎分注した。5%CO₂ インキュベーター内で 14 日培養した後、検鏡し CFU-GM (colony forming units-granulocyte macrophage) 数を算定した。

5) 統計学的解析

データ解析は Fisher 法を用い p 値を決定した。

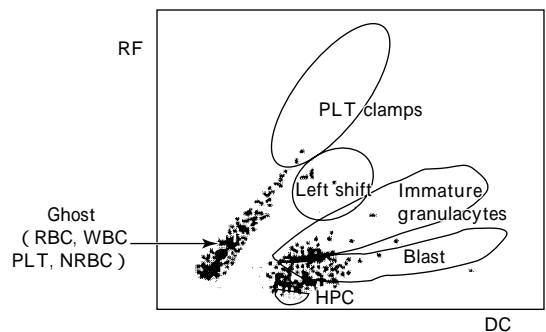


Fig. 1 IMI scattergram

結 果

1) IMI 及び HPC 細胞の測定値の経時的変化と抗凝固剤（ヘパリン，EDTA，クエン酸）の影響
採血後直ちに各凝固剤が入った試験管に分注し，室温で保存し，経時的に IMI 及び HPC を 3 重測定した（図 2）。

IMI 細胞数は，ヘパリン，クエン酸では，採血後 1 時間後には既に低下していた。EDTA では，採血 2 時間後までは IMI 細胞数は良好に保たれていた。その後の測定値は緩やかに低下した。

HPC 細胞数は，クエン酸では採血直後より低下がみられ，ヘパリンでは，採血 2 時間以後より低下していた。一方 EDTA では，採血 4 時間以後より低下が認められたが，ヘパリン，クエン酸に比し HPC 細胞数の測定値は安定していた。

2) IMI 及び HPC 細胞の測定に及ぼす検体の保存温度の影響

EDTA 採血後直ちに，4（保冷库），室温，37（恒温層）の各温度に検体を保存して，経時的に IMI 及び HPC を 3 重測定した（図 3）。

IMI 細胞数は，4 では採血 1 時間後に既に低下していた。37 では 4 時間後より緩やかに低下した。室温では採血後 2 時間までは，37 にほぼ四適する結果を示したが，その後緩やかに低下し

た。

HPC 細胞数は，37 保存で採血後，最も長時間安定した測定結果が得られた。室温保存では採血後 4 時間まで HPC 細胞数の低下は見られず，それ以後の低下も緩やかであった。一方 4 保存では，採血直後より HPC 細胞数の低下が見られた。

これらの結果より，HPC 細胞の測定には，EDTA 血で 37 あるいは室温保存が適していると思われる。臨床検体を実際に扱う上で，採血後直ちに 37 保存することは，手順が複雑で実際的でない。室温保存でも採血後 4 時間は，HPC 細胞数の測定値の低下が見られなかったことから，我々は，以後の HPC 細胞の測定には，室温保存した EDTA 血を用いて採血後 4 時間以内に測定した。

3) IMI 及び HPC 測定値の信頼性

IMI 及び HPC 細胞の測定値の同一検体における再現性を検討するために，IMI，HPC 細胞数の異なる 3 検体を用いて SE-9000 の IMI channel で連続 10 回測定を行った。検体は EDTA 血で室温保存したものをを用いた。その結果，IMI 細胞の測定値のばらつきはいずれも少なかった（表 1）。HPC 細胞の場合，HPC 40/μl 未満の 2 検体では，測定値のばらつきが大きくなっていったが，HPC 150/μl

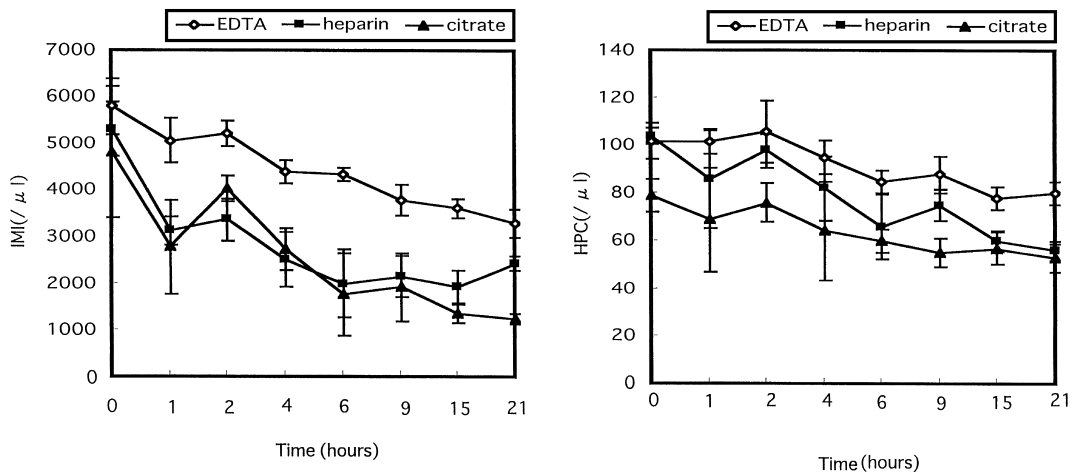


Fig. 2 Effects of three anticoagulants on time courses of IMI and HPC cell counts at room temperature. The data represent three independent experiments. Each point represents the mean ± SD for triplicate samples.

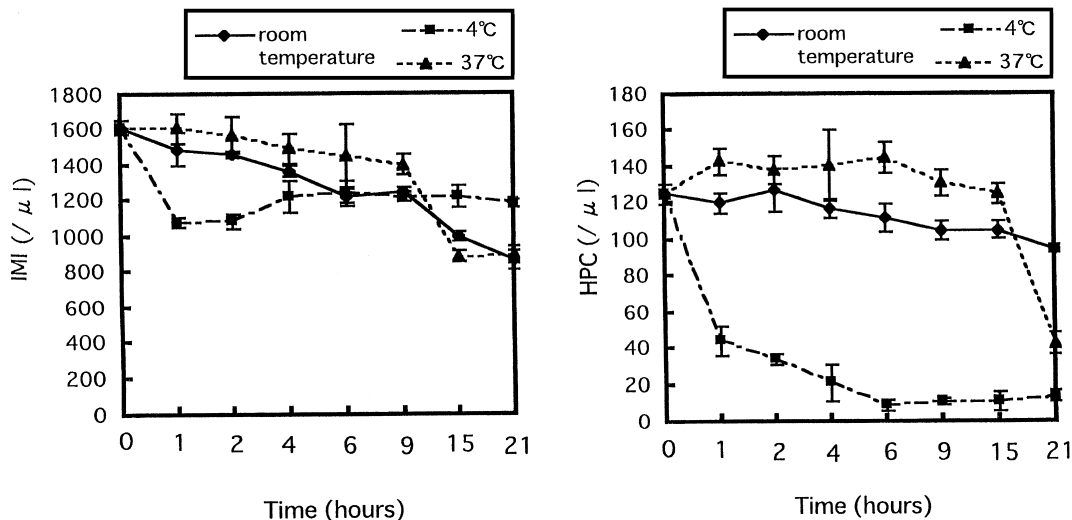


Fig. 3 Effects of temperature on time courses of IMI and HPC cell count of EDTA samples. The data represent three independent experiments. Each point represents the mean ± SD for triplicate samples.

Table 1 Reproducibility of IMI cell counts

| | sample 1 | sample 2 | sample 3 |
|-------|----------|----------|----------|
| 1 | 134 | 353 | 5,005 |
| 2 | 136 | 367 | 4,819 |
| 3 | 123 | 353 | 4,701 |
| 4 | 125 | 367 | 4,700 |
| 5 | 132 | 366 | 4,608 |
| 6 | 134 | 378 | 4,635 |
| 7 | 144 | 372 | 4,896 |
| 8 | 128 | 375 | 4,647 |
| 9 | 141 | 317 | 4,720 |
| 10 | 128 | 341 | 4,711 |
| Mean | 132.5 | 358.9 | 4,744.2 |
| SD | 6.7 | 18.6 | 125.6 |
| CV(%) | 5.1 | 5.2 | 2.6 |

Table 2 Reproducibility of HPC cell counts

| | sample 1 | sample 2 | sample 3 |
|-------|----------|----------|----------|
| 1 | 8 | 29 | 193 |
| 2 | 6 | 34 | 163 |
| 3 | 12 | 21 | 167 |
| 4 | 9 | 21 | 156 |
| 5 | 15 | 26 | 175 |
| 6 | 15 | 33 | 168 |
| 7 | 8 | 28 | 181 |
| 8 | 13 | 23 | 169 |
| 9 | 15 | 33 | 162 |
| 10 | 15 | 35 | 161 |
| Mean | 11.6 | 28.3 | 169.5 |
| SD | 3.5 | 5.4 | 10.9 |
| CV(%) | 30.5 | 19.1 | 6.5 |

以上の1検体では,再現性は良好であった(表2). さらに HPC 120/μl ~ 250/μl の検体についても同様の検討を行ったが,再現性はいずれも良好であった(データ未発表).

4 末梢血 IMI 細胞数, HPC 細胞数と末梢血 CD 34 陽性細胞数の比較検討

IMI 細胞数と HPC 細胞数は, EDTA 採血後室温保存し, 速やかに SE-9000 で測定した. CD34

陽性細胞数は, 全血法で EPICS XL を用いて測定した. 検討結果は従来の報告と同様, HPC 細胞数, IMI 細胞数と CD34 陽性細胞数では相関係数が, それぞれ $r=0.738$, $r=0.798$ といずれも良好な相関を認めた(図4).

5) 末梢血 IMI 細胞数, HPC 細胞数と採取 CD 34 陽性細胞数との比較

採取検体中の CD34 陽性細胞数の測定では, 0.5

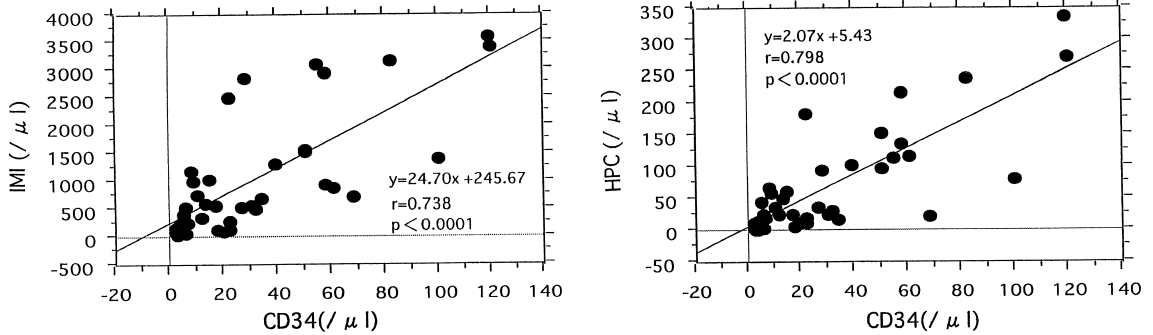


Fig. 4 Correlation between CD34-positive cell count and IMI and HPC cell count in peripheral blood.

%ヒトアルブミン及び0.1%クエン酸を含む培養液 McCoy 5A で細胞数を $1 \times 10^4/\mu\text{l}$ に調整し, EP-ICS XL を用いて測定した. 末梢血 IMI 細胞数, HPC 細胞数と採取 CD34 陽性細胞数の相関係数は, それぞれ $r=0.734$, $r=0.675$ と有為な相関を認めた(図5).

6) 採取 IMI 細胞数, HPC 細胞数と採取 CD34 陽性細胞数あるいは, CFU-GM 数との比較

採取検体の IMI 及び HPC 細胞数の測定では, 0.5% ヒトアルブミン及び0.1%クエン酸を含む培養液 McCoy 5A で白血球数を $2 \times 10^{10}/\text{L}$ 以下に希釈したものを用い, 希釈後直ちに測定した. 採取 IMI 細胞数あるいは HPC 細胞数と採取 CD34 陽性細胞数は, 相関係数がそれぞれ $r=0.691$, $r=0.769$ と有為な相関を認めた(図6). また, 採取 IMI 細胞数あるいは HPC 細胞数と採取 CFU-GM 数との比較では, 相関係数がそれぞれ $r=0.686$, $r=0.691$ と有為な相関を認めた(図7)が, 採取 CD34 陽性細胞数と採取 CFU-GM 数との相関性 ($r=0.771$) に比べやや劣っていた(データ未発表).

考 察

最近, SE-9000 の IMI channel を用いた IMI あるいは HPC 細胞数の測定が, 採取時期の判定に用いられている³⁾⁻⁸⁾. CD34 陽性細胞数との相関も良好で, しかも, 測定操作が簡単で, 迅速に結果が得られ, ランニングコストが安価であることから, 造血幹細胞採取時期の決定には有用な指標と考えられる. しかし, CD34 陽性細胞あるいは真

の意味での幹細胞を直接測定しているわけではないため, より正確な測定値を得るためには, 至適条件で検体を採取し保存しておく必要がある. ところが IMI あるいは HPC 細胞数測定のためのサンプリングの至適条件は明らかではなかった. 今回の検討から, 抗凝固剤としては EDTA を用いて, 採血後 37 あるいは室温で保存することが, HPC 細胞数の測定値に適していることが明らかになった. 臨床検体を扱う上では, 室温保存が簡便である. この場合には, 遅くとも採血後 4 時間以内には, 測定を終了しておくことが望ましい.

上記, 至適条件で同一検体を用いた IMI 及び HPC 細胞数の測定値の再現性を検討したところ, HPC $40/\mu\text{l}$ 以下の検体では, 測定値のばらつきがあったものの, IMI 及び HPC 細胞数の再現性はおおむね良好であった. 造血幹細胞採取時期の決定の目安として, 西郷ら⁶⁾は IMI $750/\mu\text{l}$, HPC $40/\mu\text{l}$ 以上, Yu ら⁸⁾は, $50/\mu\text{l}$ 以上と報告している. 従って, HPC 細胞数が少ない検体での測定値のばらつきは, 末梢血造血幹細胞採取時期を決定する上では大きな問題とはならないと思われる.

EDTA 血で室温保存した検体を用いた今回の検討でも, 末梢血 IMI 及び HPC 細胞数は, 末梢血 CD34 陽性細胞数と良好な相関がみられ, 従来の報告通り⁴⁾⁻⁸⁾, 末梢血幹細胞採取の指標として有用であった. さらに, 採取された検体中の末梢血 IMI 細胞数, HPC 細胞数により, 連続血液成分分離装置で採取した検体の CD34 陽性細胞数を予測

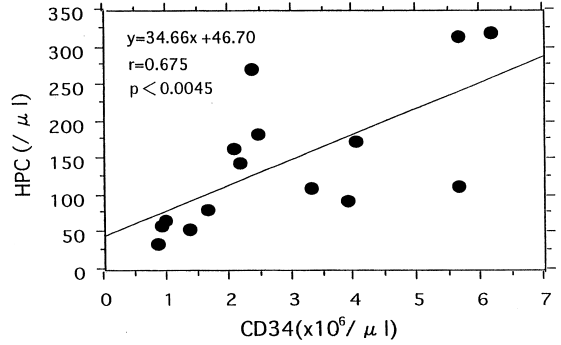
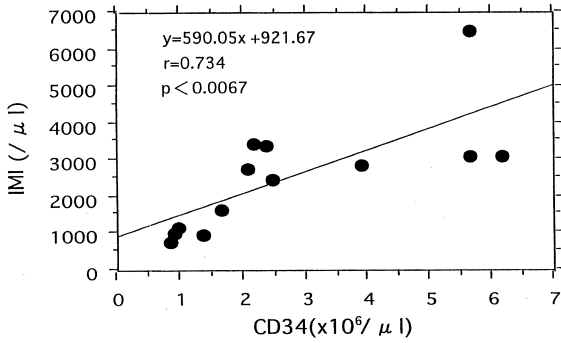


Fig. 5 Correlation between IMI and HPC cell count in peripheral blood and CD34-positive cell count of harvested samples.

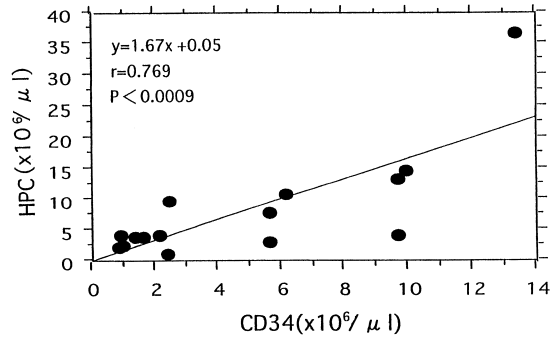
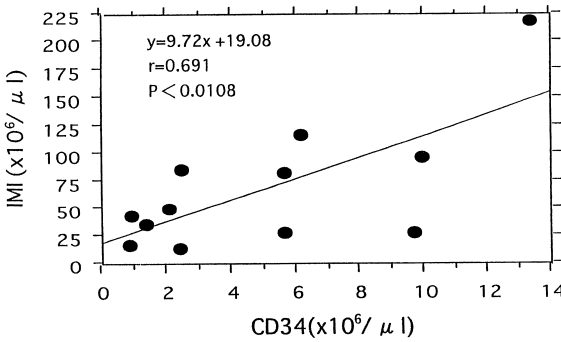


Fig. 6 Correlation between IMI and HPC cell count and CD34-positive cell count in harvested samples.

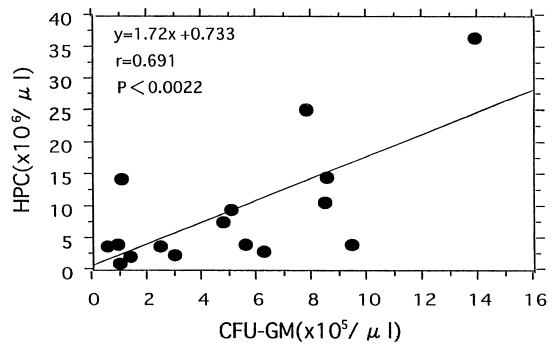
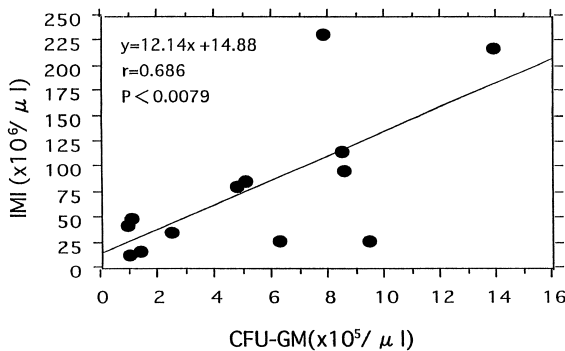


Fig. 7 Correlation between IMI and HPC cell count and CFU-GM counts in harvested samples

することも可能であった。西郷ら¹⁰⁾は、EDTA-2K (1mg/ml)を含む培養液 RPMI 1640 で希釈した

採取検体を用いて HPC 細胞数を測定し、採取 CD34 陽性細胞数と良好な相関性が見られることを

報告している。彼らの報告では、採取検体の希釈に10% クエン酸やヘパリン(5U/ml)を用いた場合は、希釈後早期よりHPC細胞数の低下が認められている。今回、我々はクエン酸を含む培養液で希釈したが、クエン酸濃度が0.1%と低かったこと、ヒトアルブミンを加えていること、希釈後直ちに測定していることなどが、採取HPC細胞数と採取CD34陽性細胞数との相関性が良好であった理由ではないかと思われる。

採取検体のHPC細胞数測定の問題点として、採取細胞の細胞膜の変化に伴う細胞の脆弱性の関与が指摘されている¹⁰⁾。しかし、その詳細は不明であり、今後は採取検体のHPC領域に出現する細胞の性状の解析などが必要と思われる。

まとめ

SE-9000を用いたIMI細胞数、HPC細胞数測定の再現性と検体の採血・保存条件を検討した。その結果、簡便で信頼性の高いHPC細胞数測定は、EDTA採血後室温保存し、4時間以内に測定することが望ましい。

文 献

- 1) Tsuda, I., et al. : Evaluation of the SE-9000 TM automated hematology analyzer : Five determinants for diagnosis of leukemia. *Sysmex J. Int.*, 4 : 18-35, 1994.
- 2) Hirata, R., et al. : The effect of fluorescent substances on the measurement of reticulocytes using automated reticulocyte analyzers R-1000 TM

and R-3000TM *Sysmex J. Int.*, 2 : 10-15, 1992.

- 3) Yamane, T., et al. : Possibility of identification of hematopoietic stem cells using a conventional blood cell counter. *Eur. J. Haematol.*, 55 : 207-208, 1995.
- 4) Takekawa, K., et al. : Identification of hematopoietic stem cells by the SE-9000 automated hematology analyzer in peripheral blood stem cell harvest samples. *Acta Haematol.*, 98 : 54-55, 1997.
- 5) Mougi, H., et al. : Determining the optimal time for peripheral blood stem cell harvest by detecting immature cells (immature leukocytes and immature reticulocytes) using two newly developed automatic cell analyzers. *Int. J. Hematol.*, 66 : 303-313, 1997.
- 6) 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。日本輸血学会雑誌, 44(5) : 605-609, 1998.
- 7) Pollard, Y., et al. : Use of the haemopoietic progenitor cell count of the Sysmex SE-9500 to refine apheresis timing of peripheral blood stem cells. *Brit. J. Haematol.*, 106 : 538-544, 1999.
- 8) Yu, J., et al. : Enumeration of HPC in mobilized peripheral blood with the Sysmex SE9500 predicts final CD34+ cell yield in the apheresis collection. *Bone Marrow Transplant.*, 25 : 1157-1164, 2000.
- 9) 山根孝久, 他 : 血液幹細胞の簡易測定法。臨床病理, 46(4) : 367-371, 1998.
- 10) Saigo, K., et al. : Estimation of Stem Cell Fractions in Peripheral Blood Stem Cell Harvest by Using an SE-9000 Hematology Analyzer. *Acta Hematol.*, 103 : 157-161, 2000.