

原 著

凍結臍帯血中の CD34 陽性細胞測定法 ProCOUNT 法と 7-AAD 法による比較検討

塩谷 美夏 長村(井上)登紀子 須郷美智子 崔 硯
高橋 敦子 平井 雅子 高橋 恒夫

東京大学医科学研究所 細胞プロセッシング研究部門

(平成 16 年 1 月 9 日受付)

(平成 16 年 2 月 23 日受理)

MEASUREMENT OF CD34-POSITIVE CELLS IN FROZEN CORD BLOOD : COMPARISON OF THE ProCOUNT AND 7-AAD METHODS

Mika Shioya, Tokiko Nagamura-Inoue, Michiko Sugo, Yan Cui,
Atsuko Takahashi, Masako Hirai and Tsuneo Takahashi

Division of Cell Processing, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

The measurement of CD34 + cells is becoming important as an assessment of the quality of cord blood (CB) units for transplantation. In the cryopreserved sample, it is demanded accurate method that excludes non-viable cells those are damaged during freezing and thawing. The ProCOUNT method which we have used so far is impossible to distinct non-viable cells from viable cells in counting CD34 + cells.

In this study, we compared the ProCOUNT method with the 7-AAD (7-amino actinomycin D) method, which can detect and exclude non-viable cells from CD34 + cell analysis. In fresh CB (n = 50), the concentrations of CD34 + cells by the ProCOUNT and 7-AAD methods were $63.1 \pm 64.6/\mu\text{L}$ and $68.3 \pm 65.7/\mu\text{L}$, respectively. In frozen-thawed CB (n = 60) concentrations by the ProCOUNT and the 7-AAD method were $97.9 \pm 71.5\mu\text{L}$ and $67.6 \pm 48.6/\mu\text{L}$, respectively, this difference being significant ($p < 0.0001$) The correlation between CD34 + cells by the 7-AAD method and colony-forming cells (CFCs) in frozen-thawed CB was higher than by the ProCOUNT method ($r = 0.82$) These results indicate that, by excluding non-viable cells, the 7-AAD method provides a more accurate count of CD 34 + cells than the ProCOUNT method, especially in frozen-thawed units.

Key words : CD34 + cell, non-viable cell, cord blood, ProCOUNT, 7-AAD

はじめに

臍帯血移植は造血幹細胞移植の手段として近年急速に増加してきているが、骨髄移植に比べ好中球や血小板の生着に遅延が見られる事が重要な問題の一つである¹⁾²⁾。これまで移植後の生着速度の評価には移植される臍帯血中の総有核細胞数が目安として用いられてきたが、最近移植臍帯血中に

含まれる患者体重当たりの CD34 陽性細胞数が一定の数値を超えると生着速度が速まる事が我々の施設を含めて報告されており³⁾⁴⁾、CD34 陽性細胞数の測定は移植臍帯血の有効性や安全性における品質評価法として重要である。特に臍帯血移植においては凍結された細胞が解凍されて患者に移植されるため、凍結解凍後における CD34 陽性細胞

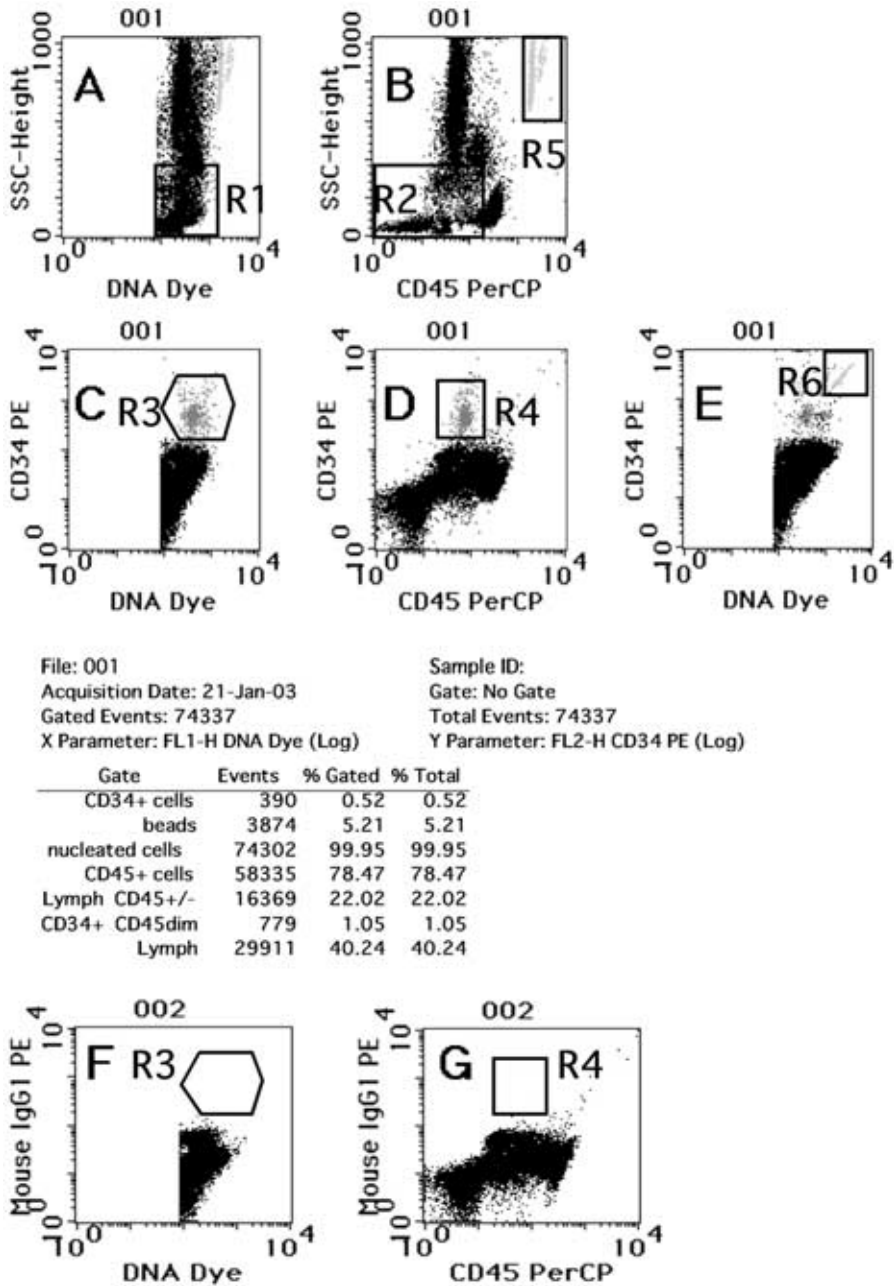


Fig. 1 Representative plots of frozen-thawed samples by the ProCOUNT method.

A : DNA-Dye vs. SSC plot (no gate) Region 1 (R1) is drawn around the lymphocyte population extending into the monocytes but excluding any debris. B : CD45 PerCP vs. SSC plot(no gate). R2 is drawn to include the CD45^{dim} leucocytes. R5 includes bead population. C and F : DNA-Dye vs. CD34(IgG1) PE plot in R1 and R2 gate. R3 and R4 are drawn to include the bright CD34 + cell fraction. D and G : CD45 PerCP vs. CD34 (IgG1) PE plot (no gate) E : R6 includes bead population. F and G : Control-stained sample. Very few events in the CD34 region are shown.

数の正確な測定が重要になりつつある。国内の臍帯血バンクでは移植用臍帯血本体と同時に検査用サンプルが凍結保存されており、移植依頼のあった時点で解凍して検査を行い、臍帯血本体の品質を確認している。しかし、臍帯血中の有核細胞は凍結感受性の異なる細胞からなり、凍結損傷を受けた細胞は移植において有効な細胞となり得ない事から、それらの細胞を除いて生着に有効な CD34 陽性細胞数を正確に得る事が必要となる。これまで我々は解凍検査における CD34 陽性細胞数の測定に ProCOUNT™ kit (Becton Dickinson: BD, San Jose, CA) によるフローサイトメトリー法を用いてきた⁵⁾。これは核染色剤 (DNA-Dye), CD34 抗体, CD45 抗体を用いて細胞を染色後、測定時に DNA-Dye に閾値を設定する事により不要な細胞断片を除外し、有核細胞を検出した後 CD45 陽性細胞 (全白血球分画) から CD34 陽性細胞を検出する方法である。しかし、この方法では死細胞そのものを分別して染色し検出する事はできなかった。

7-AAD (7-amino actinomycin D) は膜の形状が保てなくなった細胞に浸透しやすく、DNA のグアニン シトシン間に入り込む核染色剤であり、アポトーシス細胞や死細胞の検出試薬として一般的に用いられている⁶⁾⁻⁹⁾。また国際血液療法標準化学会 (ISHAGE: International Society of Hematology and Graft Engineering) では 7-AAD により死細胞を検出除去する CD34 陽性細胞測定法が推奨されている¹⁰⁾。今回我々はこの ISHAGE 法を参考に、7-AAD を CD34 抗体, CD45 抗体と組み合わせる方法をこれまでの ProCOUNT 法と比較した。その結果、ProCOUNT 法では測定された CD34 陽性細胞中にも死細胞が含まれており、それが測定値に影響を与えていると考えられた。また、7-AAD 法での CD34 陽性細胞数測定値と CFCs との相関は ProCOUNT 法と比較して良好であった。以上の結果から、7-AAD を用いた方法は凍結臍帯血中の CD34 陽性細胞数測定法として有用と考えられたので報告する。

対 象

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かつ採取後 24 時間以内に細胞処理された臍帯血を対象とした。

凍結前サンプルとして非凍結臍帯血 50 検体を用いた。凍結解凍後サンプルは、細胞分離後凍結保存された臍帯血 60 検体 (解凍検査用サンプル 49 検体, 凍結臍帯血本体 11 検体) を用いた。

方 法

1. 細胞分離及び凍結

臍帯血の細胞分離は HES 遠心法で行った⁴⁾¹¹⁾。遠心後パフィーコート及び細胞回収率を上げるため RBC 層の一部を回収した。凍害保護液は 10% DMSO/1% Dextran40 (最終濃度) を用い、検査用サンプルは -80 フリーザー内で冷却速度を -2 /分に調整する方法、本体を同法あるいは BioArchive System (Thermogenesis Co., Cordova, CA) を用いた全自動化凍結法で行った。

2. 解凍

37 温水中にて急速解凍後、凍害保護物質を除去する為に洗浄を行った⁴⁾¹¹⁾。即ち最終濃度 2.5% ヒトアルブミンと 5% Dextran40 からなる洗浄液を等量加えた後に遠心分離 (400G, 10 , 10 分) し、等量の上清を除去し細胞ペレット側 (WBC 側) に再度洗浄液を等量ずつ 2 回に分けて加えた。これにより DMSO 濃度は 10% から段階的に希釈され最終的には 1.67% となった。

3. CD34 陽性細胞数の測定

上記方法にて解凍洗浄したサンプル及びコントロールとして凍結前サンプルを ProCOUNT 法、7-AAD 法にて測定し両者の結果を比較した。

3.1. ProCOUNT 法

ProCOUNT kit (BD) は絶対数算出用ビーズ入り試験管 TRUCOUNT™ tube, DNA-Dye/CD34 PE/CD45PerCP 試薬, DNA-Dye/Mouse γ 1 (Control) PE/CD45PerCP 試薬が一つにキットかされたものである。付属の TRUCOUNT tube をビーズに凝集がない事を確認した上で 2 本用意し、一方に CD34 試薬を 20 μ l, もう一方のチューブにコントロール試薬を 20 μ l 加え、それぞれのチューブにサンプルを 50 μ l ずつ加えた。室温暗所で 15 分間インキュベーションし、次に 10 倍希釈した FACS Lysing Solution (BD) を 450 μ l 加えた。我々

の HES 法による細胞分離では RBC 層の一部も回収する方法を取っており、測定時に debris として測定の妨げになるため Lysing Solution による溶血処理後 FACS Calibur (BD) で測定した。解析は ProCOUNT 法のゲート設定法に従い¹²⁾、得られた数値を以下の計算式に当てはめ CD34 陽性細胞絶対数を算出した。

CD34 陽性細胞絶対数 ($/\mu\text{l}$) = (測定 CD34 陽性細胞数 / 測定ビーズ数) \times (試験管既知ビーズ数 / サンプル量)

3.2. 7-AAD 法

ProCOUNT 法で使用したものと同一のビーズ入り試験管 TRUCOUNT tube (BD) に CD45 FITC/CD34PE Combination 試薬 (BD) を $20\mu\text{l}$ 、Via-Probe™ 7-AAD Staining Solution (BD) を $20\mu\text{l}$ 加え、その中にサンプル $50\mu\text{l}$ を加えた。室温暗所で 15 分間インキュベーションし、さらに 10 倍希釈した固定剤不含、塩化アンモニウムベース溶血剤 Pharmlyse™ Reagent (BD) を 1ml 加えて RBC を溶解させた後 FACS Calibur にて測定した。解析は ISHAGE ガイドラインの CD34 陽性細胞ゲート設定法¹⁰⁾¹³⁾を一部 7-AAD のゲートに関して修正を加え、ProCOUNT 法と同一の計算式より CD34 陽性細胞絶対数を算出した。

4. コロニー形成細胞数 (CFCs) の測定

メチルセルロース培地 (MethoCult GF H4434 V, StemCell Technologies Inc., Vancouver, Canada) 2.5ml にサンプルを $5\mu\text{l}$ 又は $10\mu\text{l}$ 播種し、 $35 \times 10\text{mm}$ ディッシュ 2 枚に 1ml ずつ分注した。これを 37℃、5%CO₂ 存在下にて培養し、14 日後に赤芽球バースト形成細胞 (BFU-E)、顆粒球マクロファージコロニー形成細胞 (CFU-GM)、混合コロニー形成細胞 (CFU-Mix) をカウントした。これら全ての種のコロニー形成細胞数の合計を全コロニー形成細胞 CFCs とした。

5. 統計処理

ProCOUNT 法、7-AAD 法で得られた CD34 陽性細胞数を比較し、Student t-test により有意差を検定した。また CFCs と両方法における CD34 陽性細胞数の相関について検討し、相関係数を算出した。有意差検定は $p < 0.01$ で有意とした。

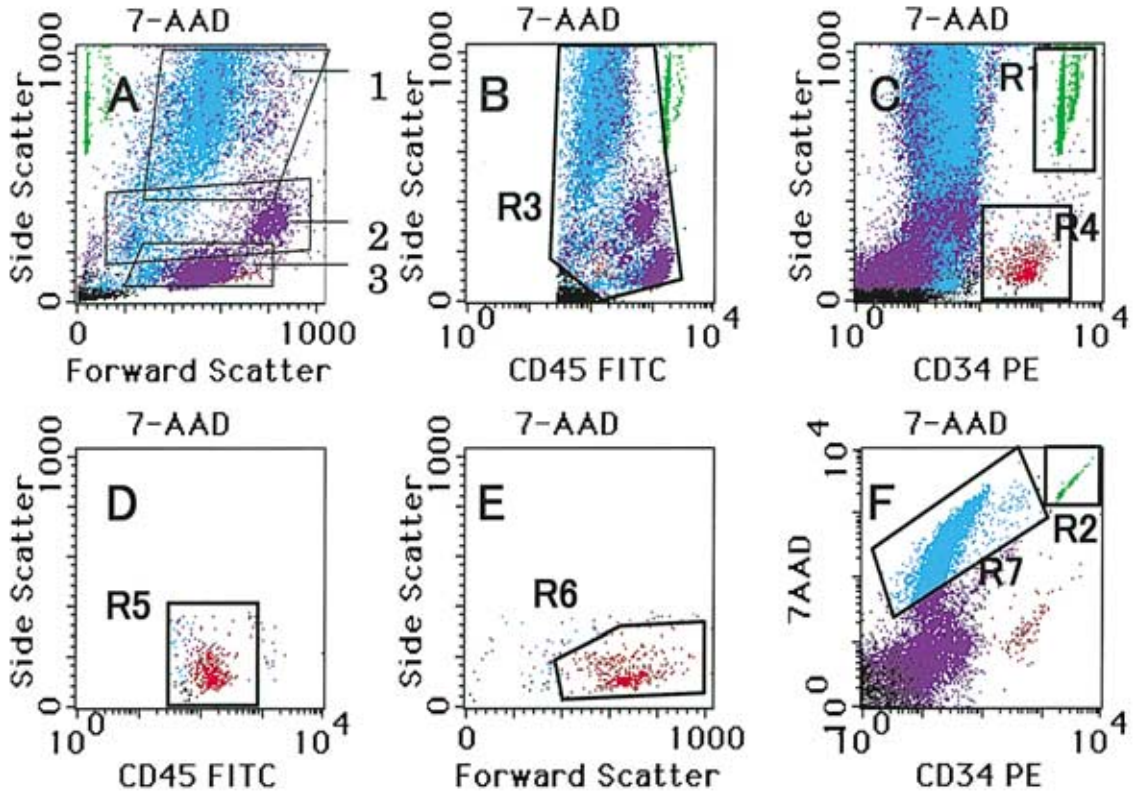
結 果

ProCOUNT 法および 7-AAD 法による解析工程および結果を Fig. 1 および 2 に示した。

ProCOUNT 法では、CD34 陽性造血幹細胞は SSC (Side Scatter) が低く、かつ DNA-Dye に強く染色され CD45 弱陽性を呈する事から、DNA-Dye vs. SSC ドットプロット (Fig. 1A) 上でリンパ球及び単核球集団の一部をゲーティングした (R1)。また同時に CD45 vs. SSC ドットプロット (Fig. 1B) 上で CD45 弱陽性発現の範囲をゲーティングし (R2)、DNA-Dye vs. CD34 ドットプロットで他の有核細胞から CD34 陽性細胞を検出した (Fig. 1C-R3)。

7-AAD 法では CD45 vs. SSC ドットプロット (Fig. 2B) 上で CD45 陽性細胞全体をゲーティングした後 (R3) CD34 vs. SSC (Fig. 2C) 上で CD34 陽性細胞集団をゲーティングした (R4)。R4 を CD45 vs. SSC (Fig. 2D) に展開し再び CD34 陽性細胞集団をゲーティングし (R5)、R4 と R5 を FSC (Forward Scatter) vs. SSC (Fig. 2E) 上に展開し CD34 陽性細胞集団をさらにゲーティングした (R6)。そして CD34 vs. 7-AAD (Fig. 2F) 上にて 7-AAD で染色された死細胞群をゲーティングした (R7)。死細胞は FSC の検出強度が低下する傾向があるが¹⁴⁾、FSC vs. SSC ドットプロット (Fig. 2A, E) での 7-AAD 陽性細胞 (水色で示す) の分布からそれを確認できた。7-AAD 陽性細胞集団を見ると、凍結傷害を受け死細胞となる細胞種は好中球を主とする成熟顆粒球が大部分であり (Fig. 2A, Gate 1)、CD34 陽性細胞中の死細胞は顆粒球分画に比べ少数であった。CD34 陽性細胞ドット (赤で示す) は CD45 陽性、R6 かつ R7 ではない細胞重複の為削除とした。

各測定法による CD34 陽性細胞数は、凍結前サンプル ($n = 50$) では ProCOUNT 法で $63.1 \pm 64.6 / \mu\text{l}$ (平均 \pm SD)、7-AAD 法で $68.3 \pm 65.7 / \mu\text{l}$ (平均 \pm SD) と両者に有意差は認められなかった (Table 1)。一方、凍結解凍後サンプル ($n = 60$) においては ProCOUNT 法では $97.9 \pm 71.5 / \mu\text{l}$ (平均 \pm SD)、7-AAD 法では $67.6 \pm 48.6 / \mu\text{l}$ (平均 \pm SD) であり、7-AAD 法の測定値は ProCOUNT 法に比べ



Gate: No Gate
 Gated Events: 75000
 Total Events: 75000

Gate	Events	% Total
CD34+ cells	345	0.46
CD45+ cells	27223	36.30
beads	4192	5.59
dead cells	35954	47.94
G4	448	0.60
G5	17723	23.63
G6	428	0.57

Fig. 2 Representative plots of frozen-thawed sample by 7-AAD methods.

A : FSC vs. SSC plot (no GATE) 1. granulocytes, 2. monocytes, 3. lymphocytes populations. B : CD45FITC vs. SSC plot (no gate) R3 is drawn around the CD45 population including CD45^{dim} and CD45^{bright}. C : CD34PE vs. SSC plot (R3 gate) R4 is drawn to include the bright CD34 cell population. R1 includes bead population. D : CD45 FITC vs. SSC plot (R4 gate) R5 is drawn around the cluster of CD45^{dim} cells in this plot. E : FSC vs. SSC plot (R4 and R5 gate) R6 is drawn around the cluster of high forward scatter events. F : CD34 vs. 7-AAD plot (no gate). R7 is drawn around 7-AAD positive cells (dead cells) R2 includes bead population.

Table 1 Comparison of CD34⁺ counts in fresh and frozen-thawed cord blood units by the ProCOUNT and 7-AAD methods. (/ μ l)

	ProCOUNT method	7-AAD method	<i>p</i>
Fresh (n = 50)	63.1 ± 64.6 (7.0 ~ 288.8)	68.3 ± 65.7 (9.3 ~ 303.6)	0.003
Frozen-thawed (n = 60)	97.9 ± 71.5 (1.83 ~ 396.82)	67.6 ± 48.6 (0.97 ~ 270.28)	< 0.0001#

Data are shown as the mean ± SD (range).

#Significant difference between ProCOUNT and 7-AAD methods.

Fresh samples are pre-freezing CB ; , frozen-thawed samples include 49 cryopreserved reference samples and 11 transplanted CB units at IMSUT.

て有意に細胞数の減少が認められた (Table 1).

解凍後サンプルにおける7-AAD陽性細胞すなわち核染色された死細胞は、顆粒球分画が大部分を占めており単核球分画は少数であった (Fig. 2A).

CFCsとCD34陽性細胞数との相関はProCOUNT法で $r = 0.65$ (Fig. 3A), 7-AAD法で $r = 0.82$ (Fig. 3B)となり、7-AAD法では高い正の相関を認めた .

考 察

これまで我々がCD34陽性細胞数測定に用いていたProCOUNT kitによるフローサイトメトリ法は、簡便で迅速な測定法であり、正確かつ再現性のよい安定した方法とされてきた^{5) 15) 16)} .

ProCOUNT法では核染色剤DNA-Dyeにより有核細胞を核染色し、サンプルに含まれる破碎された細胞や細胞以外のdebrisを測定から除外している . しかしこの核染色剤は死細胞も含めた全ての細胞膜に浸透するため、生細胞と死細胞の区別までは不可能であった¹⁷⁾ . このため臍帯血の細胞分離保存において混入する顆粒球を中心とした死細胞の発生が避けられない凍結解凍後サンプルにおいて、移植に有効なCD34陽性細胞数の実数値が得られているのかどうか疑問であった . 今回我々は凍結解凍後におけるCD34陽性細胞中の死細胞除去に着眼し、7-AADを用いた方法を検討した . 今回の検討は同一サンプルにおける凍結前後

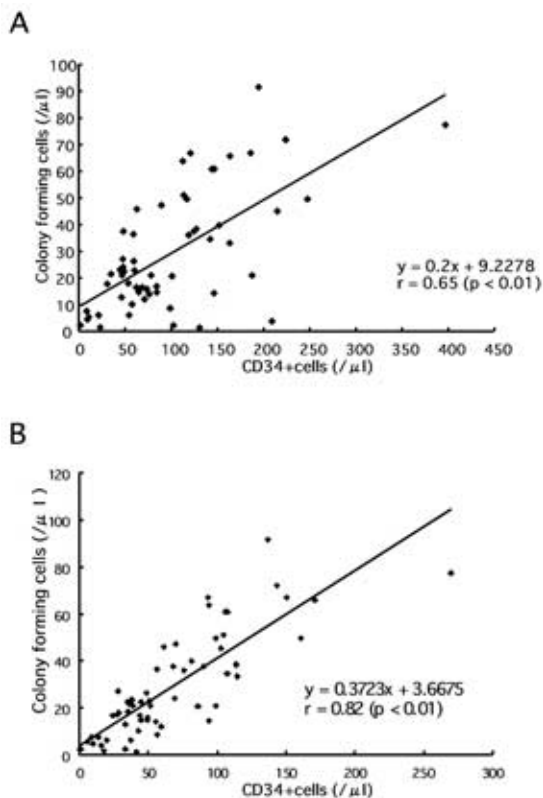


Fig. 3 Correlation of CD34⁺ cells to colony forming cells (CFCs) in frozen-thawed cord blood. (n = 60) A : ProCOUNT method, B : 7-AAD method. The correlation between CD34⁺ cell counts and colony-forming cells (CFCs) in frozen-thawed CB was higher in the 7-AAD method ($r = 0.82$) than the ProCOUNT method ($r = 0.65$)

についての結果をみたものではないが、凍結前の7-AAD法によるCD34陽性細胞数はProCOUNT法に対し低下は認めず、一方解凍後には有意に減少していた (Table 1). 解凍後では凍結の影響によって発生する死細胞が測定値に誤差を生じさせる事を示しており、解凍後サンプルでの7-AAD法による測定細胞数の減少はCD34陽性細胞数中の死細胞が検出除去された事によるものと考えられる . ProCOUNT法では細胞内顆粒状況、核酸染色状況、CD45発現状況、そしてCD34の抗原発現といったゲートを使用し解析を行っている¹²⁾ . 一方7-AAD法ではISHAGEでも推奨されている通

り¹⁰⁾¹³⁾, CD34 陽性細胞集団のみを段階的に絞り込んでいき, さらに 7-AAD 陽性の死細胞を除外するゲーティング法が用いられており, より正確な CD34 陽性細胞数を得る事が可能である. ISHAGE の推奨方法は SSC vs. 7-AAD ドットプロットにて 7-AAD 陽性細胞を除外しているが, 今回我々は小川らの方法に従い CD34 vs. 7-AAD にてゲートを展開した. 我々の方法では前者に比べ 7-AAD 陽性細胞のゲート (R7) の設定が容易であり, これにより作業者間の誤差も少なくできるものと思われる. 死細胞, 即ち 7-AAD 陽性細胞集団は凍結解凍時に傷害を受けたと思われる好中球を主とする成熟顆粒球が大部分を占めており, CD34 陽性細胞中の死細胞は顆粒球分画に比べ少数であった.

また, CD34 陽性細胞数と CFCs の間には 7-AAD 法, ProCOUNT 法共に正の相関が認められたが (Fig. 3A, B), 7-AAD 法ではより高い相関が得られた ($r=0.82$). この結果から, 7-AAD 法での CD34 陽性細胞数はより厳密なコロニー形成細胞数を反映しており, 生着に有効な生きた CD34 陽性細胞数の実数を示している事が確認された.

なお, この方法では, 死細胞の検出対象を有核細胞全体としてゲーティングを行っている. 検出された死細胞は Gate list に死細胞 (dead cell) として表示されるが (Fig. 2), CD34 陽性細胞中の死細胞が数値では確認できないため今後ソフトの改良が必要とされる. またゲーティングを個人差や施設間の差が生じない様より明確にしていく事も課題点であり, 今後より安定し確立された測定法としての改善が望まれる.

結 語

凍結臍帯血中の CD34 陽性細胞測定法として, 7-AAD 法は従来の ProCOUNT 法と比較してより正確な測定値を得る事が可能であり, 臍帯血バンクにおける解凍後品質確認の手段として有用な測定法である.

謝辞

臍帯血の採取にご協力頂きました東京臍帯血バンク採取施設病院 (浜田病院, 慶應義塾大学病院, 順天堂大学浦

安病院, 山口病院, 賛育会病院, 日本医科大学多摩永山病院) に深謝致します.

文 献

- 1) Rocha, V., Wagner, J.E., et al. : Graft-versus host disease in children who have received a cord blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. *The New England Journal of Medicine*, 342 : 1846-1854, 2000.
- 2) Rocha, V., Cornish, J., et al. : Comparison of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood*, 97 : 2962-2971, 2001.
- 3) Wagner, J.E., Barker, J.N., et al. : Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases : influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood*, 100 : 1611-1618, 2002.
- 4) Nagamura-Inoue, T., Shioya, M., et al. : Wash-out of DMSO does not improve the speed of engraftment of cord blood transplantation : follow-up of 46 adult patients with units shipped from a single cord blood bank, Tokyo Cord Blood Bank. *Transfusion*, 43 : 1285-1294, 2003.
- 5) 芹澤 領, 安武幹智, 他 : 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. *日本輸血学会雑誌*, 45 (6) : 669-676, 1999.
- 6) Philpott, N.J., Turner, A.J.C., et al. : The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis : simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood*, 87 : 2244-2251, 1996.
- 7) Pallis, M., Syan, J., Russell, N.H. : Flow cytometric chemosensitivity analysis of blasts from patients with acute myeloblastic leukemia and myelodysplastic syndromes : the use of 7AAD with antibodies to CD45 or CD34. *Cytometry*, 1 ; 37 (4) : 308-313, 1999.
- 8) Schmid, I., Hausner, M.A., et al. : Simultaneous flow cytometric measurement of viability and lymphocyte subset proliferation. *Journal of Immunological Methods*, 247 : 175-186, 2001.
- 9) Waters, W.R., Harkins, K.R., Wannemuehler M. J. : Five-color flow cytometric analysis of swine lymphocytes for detection of proliferation, apoptosis, viability, and phenotype. *Cytometry*, 48 : 146-152, 2002.
- 10) Blocklebank A.M., Sparrow R.L. : Enumeration of CD34+ cells in cord blood : A variation on a

- single-platform flow cytometric method based on the ISHAGE gating strategy. *Cytometry*, 46 : 254-261, 2001.
- 11) Rubinstein, P., Dobrila, L., et al. : Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 : 10119-10122, 1995.
- 12) Ward, T., Greiner, K., et al. : ProCOUNT : Setting the standard for progenitor cell enumeration. Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, 1997.
- 13) Sutherland, D.R., Anderson, L., et al. : The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. Journal of Hematotherapy*, 5 : 213-226, 1996.
- 14) Manion, K., Frey, T. : Apoptosis of cells in aged samples as detected by the ProCOUNT reagent. *Cytometry*, 26 : 317-322, 1996.
- 15) 河本順雄, 下山丈人, 他 : ProCOUNT 法による CD34 陽性細胞数の測定 従来法との比較 . 日本輸血学会雑誌, 44 (1) : 35-40, 1998.
- 16) 鎌田美乃里, 川嶋一成 : 臍帯血造血幹細胞数測定法に関する研究 プロカウント (ProCOUNT) 法を用いた臍帯血 CD34 陽性細胞数およびそのサブポピュレーションの計測 . 慈恵医大誌, 116 : 173-181, 2001.
- 17) 小川恵津子 : フローサイトメトリー法による CD34+ 細胞測定 . 日本検査血液学会雑誌, 4 (1) : 92-98, 2003.
-