

異なる測定キットを用いたフローサイトメーター 2 機種間の CD34 陽性細胞数測定と比較 : Cytomics FC500 と Facs Calibur

斎藤 俊一 奥津 美穂 小幡 悠子 川畑 絹代 安田 広康
池田 和彦 菅野 隆浩 大戸 齊

造血幹細胞の CD34 陽性細胞測定にフローサイトメーターが用いられているが、測定方法の違いによりその値が異なることが報告されている。Cytomics FC500 と Facs Calibur を用いて計 131 検体 (末梢血 75 件, 末梢血幹細胞採取 (PBSC) 40 件, 凍結解凍 PBSC 16 件) を測定し, CD34 陽性率および陽性細胞数を解析した。CD34 陽性率は両機種間で高い相関 (末梢血で $R^2=0.980$, PBSC で $R^2=0.979$, 解凍 PBSC で $R^2=0.979$) を認めた。CD34 陽性細胞数絶対値も両機種は良い相関を示した (末梢血 ; $R^2=0.975$, PBSC ; $R^2=0.971$, 解凍 PBSC ; $R^2=0.678$)。PBSC と解凍 PBSC における single-platform 法と two-platform 法の比較では Cytomics FC500, Facs Calibur とともに CD34 陽性細胞の絶対数に有意な差は認められなかった。だが, 末梢血検体では両機種とも two-platform 法は single-platform 法よりも, CD34 陽性細胞数が有意に低値だった (Cytomics FC500 : $p=0.005$, Facs Calibur : $p=0.0004$)。

また, CD34 陽性細胞測定における誤差要因を Cytomics FC500 で調べた。single-platform 法, two-platform 法ともに希釈前後で有意差はなかった。次にビーズを添加する際の誤差を見るため, 既にビーズが入っている Trucount Tube を使用した場合と, 後でビーズを添加した場合で比較した。Trucount Tube を用いた検体では後でビーズを添加した検体に比べて有意に CD34 陽性細胞数が高く, 最もばらつきが少なかった。

今回の結果から, 異なる機種でも絶対値測定用ビーズを用いる single-platform 法は同値の CD34 陽性細胞が得られたため, 国際血液療法標準化学会が推奨する施設間差の少ない値が得られると考えられた。特に, Trucount Tube を用いると再現性の良い結果を得られることが分かった。

キーワード : フローサイトメトリー, CD34 陽性細胞, single-platform 法, two-platform 法

はじめに

化学療法を併用した末梢血造血幹細胞移植は, 造血器腫瘍や固形腫瘍の治療法の一つとして広く用いられており, 幹細胞採取量の評価法としてフローサイトメトリーによる CD34 陽性細胞数の測定が行なわれている。しかし, 測定機器やプロトコルの違いによって, 測定値が異なり^{1)~3)}, 施設間でデータの比較ができないという問題がある。そのために, 他施設で採取された骨髓や臍帯血などを自施設で測定した際造血幹細胞数の不足が生じる可能性もある。また, 測定者により誤差が生じやすいこともフローサイトメトリーによる問題点と考えられる。

われわれは, フローサイトメーターの違いによって, あるいは測定キットの違いによって, CD34 陽性細胞数にどの程度影響するのかを検討するため, Cytomics FC500 (BECKMAN COULTER, BC) と Facs Calibur (Becton Dickinson, BD) による CD34 陽性細胞率, お

よび CD34 陽性細胞数について, 国際血液療法標準化学会 (ISHAGE : The International Society of Hematology and Graft Engineering, 現 ISCT : International Society for Cellular Therapy) で推奨されている各機種の標準プロトコルを用いて比較検討した。また, CD34 陽性細胞数算定法には, 補正が要らない絶対値測定用ビーズを用いる single-platform 法と, CD34 陽性細胞率に血算値を乗算して補正する two-platform 法があり, 両算定法による CD34 陽性細胞数についても比較検討した。また, 測定の際の時点で誤差が出現しやすいかを検討し, 対策を考えるため, 同一検体を測定し, 希釈, ピペット操作のそれぞれで検討を行なった。

対象と方法

1. 対象

2004 年 5 月から 2007 年 2 月に末梢血造血幹細胞 peripheral blood stem cell (PBSC) を採取し, CD34 陽性

細胞数測定を行なった末梢血 peripheral blood (PB) 86 件(両機種：26 件, Cytomics FC500 のみ：53 件, Facs Calibur のみ：44 件)と PBSC 検体 56 件を対象とした。PBSC の 56 検体中 40 件 (13 件, 19 件, 15 件) は新鮮サンプルを, 16 件 (15 件, 16 件, 16 件) は液体窒素中で凍結保存していたサンプルを用いた。

2. 方法

1) サンプルの調製

(1) 末梢血と PBSC：測定検体は Dulbecco-PBS(1×) (免疫生物研究所) で細胞数 $10 \times 10^3/\mu\text{l}$ 以下に調整した。

(2) PBSC の解凍：約 0.5ml の凍結サンプルを 37°C 恒温槽で解凍後, IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) 40ml, FBS (Fetal Bovine Serum Qualified) 10ml, DNAase 0.5ml, ヘパリン (10,000U/ml) 0.5ml からなる解凍液を少量ずつ添加して, 凍害保護液を融出した。1,000rpm, 15 分間遠心分離後, 解凍液で一回洗浄し, 細胞数が $10 \times 10^3/\mu\text{l}$ 以下になるように調整した。

2) 細胞表面抗原染色方法

(1) Cytomics FC500：Stem Kit (BC) 法

検体測定チューブに CD45-FITC/CD34-PE (CD45-Fluoresceinisothiocyanate/CD34-Phycoerythrin, BC, FRANCE) を, 陰性対照には CD45-FITC/control-PE を 20 μl 分注し, 両チューブにサンプルを 100 μl ずつ添加した。次に, 両チューブに死細胞染色用試薬 7-amino actinomycin D (7-AAD) を 20 μl ずつ添加し, 室温暗所で 20 分間反応させた。Lysing Solution を 2ml ずつ分注し, 室温暗所で 10 分間反応させた。絶対値測定用ビーズ Stem-Count を 100 μl ずつ添加し, フローサイトメーターで測定した。

(2) Facs Calibur：Pro Count-7AAD (BD) 法

絶対値測定用ビーズが入っている Trucount Tube に CD45-FITC/CD34-PE 抗体(BD, USA) 20 μl , BD Via-Probe (7-AAD) 20 μl を分注し, サンプル 50 μl を加え, 室温暗所で 15 分間反応させた。赤血球溶血剤 BD PharM Lyse を 1ml 加え, 3~5 分後に測定した。

3) フローサイトメーターによる解析

(1) Cytomics FC500

7-AAD vs 側方散乱光 (Side Scatter, SS) で 7-AAD 陰性の生細胞のうち, CD45-FITC 陽性の白血球分面の細胞 75,000 個を測定し, そのうち CD34-PE 陽性で CD45-FITC 弱陽性の細胞をゲートした。最後に前方散乱光 (Forward Scatter, FS) vs SS で SS 低値の細胞をゲートして CD34 陽性細胞集団とした。

(2) Facs Calibur

FL1 (FITC) vs SS で, CD45-FITC 陽性の白血球分面をゲートし, 次に CD34-PE 陽性の細胞をゲートした。CD45-FITC 陽性かつ CD34-PE 陽性細胞のうち, CD45-

FITC 弱陽性の細胞集団をゲートし, その細胞の FS vs SS で, SS が低い細胞集団をゲートし, 最終的な CD34 陽性細胞とした。

4) CD34 陽性細胞数 ($/\mu\text{l}$) の算定

(1) single-platform 法

single-platform 法は, 絶対値測定用ビーズを用いてフローサイトメーターの結果のみで CD34 陽性細胞数を求める方法である。

Cytomics FC500：(CD34 カウント数 - 陰性対照の CD34 カウント数) \times (既知ビーズ数/ビーズカウント数) \times 希釈倍数

Facs Calibur：(CD34 カウント数/ビーズカウント数) \times (チューブ既知ビーズ数/検体量) \times 希釈倍数

(2) two-platform 法

two-platform 法は, フローサイトメーターで求めた CD34 陽性細胞率に血算値を乗算して CD34 陽性細胞数を求める方法である。

白血球数 ($/\mu\text{l}$) \times CD34 陽性細胞率 (%) / 100

5) 誤差要因の検討

測定操作上, 個人差が生じやすい希釈操作, 試薬やサンプル採取時のピペット操作, データの解析のいずれに起因するかについて検討した。なお, 検査には single-platform 法と two-platform 法を用いた。

(1) Study A

サンプル希釈時の誤差を検討するため末梢血 (n=1), PBSC (n=1) を用いた。同じ術者が希釈から測定・解析までを行なった場合と, 希釈済みの同一検体を用いて異なる術者 (末梢血：3 人, PBSC：4 人) が測定・解析した場合を比較検討した。

(2) Study B

次に, 絶対値測定用ビーズ添加による誤差を検討するため解凍 PBSC (n=5) を用いた。絶対値測定用ビーズが入っている Trucount Tube を用いた場合と, 無添加チューブを用いた場合で比較検討した。なお, この操作は希釈から解析まで 1 人の同一術者が行なった。

6) 統計処理

統計学的検討は paired *t* test を用いて行ない, $p < 0.05$ である場合に有意差があったとした。また, 決定係数 (寄与率) R^2 を求めた。 R^2 は, あるデータ全体の変化に対して, その構成要素である個々のデータがどのように貢献しているかの指標であり, 相関係数 *R* を 2 乗したものである。

結 果

1. Cytomics FC500 と Facs Calibur の比較

1) CD34 陽性細胞率

両機種による各サンプルの CD34 陽性細胞率の相関を Fig. 1 に示した。末梢血で $R^2 = 0.980$, PBSC で $R^2 = 0.979$,

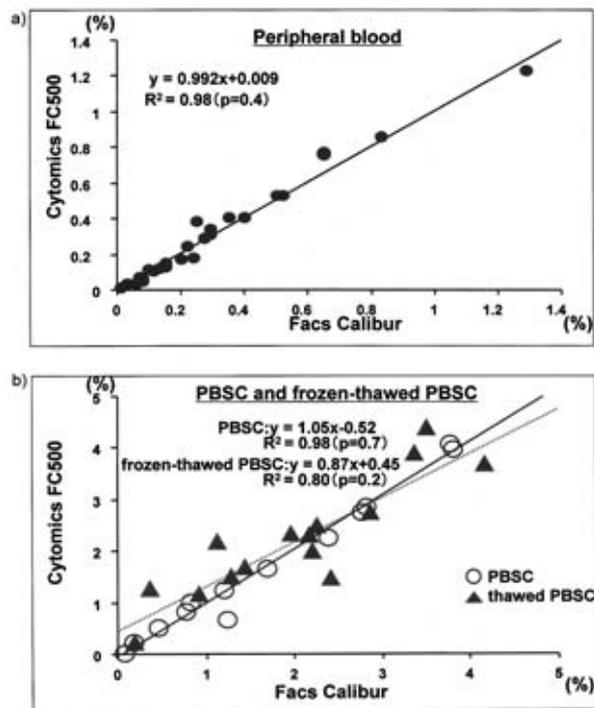


Fig. 1 Comparison of %CD34+ cell counts between the Cytomics FC500 and Facs Calibur. a) peripheral blood, b) PBSC and frozen-thawed PBSC. Results showed a high correlation coefficient ($R^2=0.980$ for peripheral blood, 0.979 for PBSC, and 0.796 for frozen-thawed PBSC) between the Cytomics FC500 and Facs Calibur.

解凍 PBSC で $R^2=0.796$ といずれも高い相関を認めた。なお、陽性率はフローサイトメーターだけで求められるので、single-platform 法と two-platform 法は等しい値が得られる。

2) CD34 陽性細胞数 ($/\mu\text{l}$) (Table 1)

両機種 of single-platform 法で得られた CD34 陽性細胞数(平均値)を検討した。末梢血, PBSC, 解凍 PBSC とも Cytomics FC500 と Facs Calibur 機種間に有意差は認めなかった。

2. single-platform 法と two-platform 法による CD34 陽性細胞数 ($/\mu\text{l}$) の比較

1) Cytomics FC500 (Table 2)

Cytomics FC500 で得られた CD34 陽性細胞数(平均値)は、末梢血では single-platform 法で $72.5/\mu\text{l}$, two-platform 法で $69.6/\mu\text{l}$ と two-platform 法が single-platform 法よりも有意に低値であった。PBSC, 解凍 PBSC では両法間に CD34 陽性細胞数の有意差は認められなかった。

2) Facs Calibur (Table 3)

Facs Calibur で得られた CD34 陽性細胞数(平均値)は末梢血の single-platform 法で $37.5/\mu\text{l}$, two-platform 法で $34.8/\mu\text{l}$, と two-platform 法が single-platform 法よりも有意に低値であった。PBSC, 解凍 PBSC では Cy-

Table 1 Absolute number of CD34+ cells using the single-platform method in a Cytomics FC500 and Facs Calibur

Sample	Cytomics FC500 mean \pm SD ($/\mu\text{l}$) (range)	Facs Calibur mean \pm SD ($/\mu\text{l}$) (range)	P value
PB n = 26	49.5 \pm 49.3 (1 ~ 216)	46.4 \pm 45.7 (1 ~ 207)	0.071
PBSC n = 13	4,418.4 \pm 3,951.1 (160 ~ 12,450)	3,644.0 \pm 3,559.0 (87 ~ 11,411)	0.052
frozen-thawed PBSC n = 15	6,335.1 \pm 6,048.3 (260 ~ 16,050)	6,889.4 \pm 6,626.2 (690 ~ 19,577)	0.54

PB: peripheral blood

PBSC: peripheral blood stem cell

Table 2 Absolute number of CD34+ cells using the single-platform method and two-platform method in a Cytomics FC500

Sample	single-platform mean \pm SD ($/\mu\text{l}$) (range)	two-platform mean \pm SD ($/\mu\text{l}$) (range)	P value
PB n = 79	72.5 \pm 82.0 (1 ~ 368)	69.6 \pm 79.2 (1 ~ 362)	0.005
PBSC n = 32	2,865.0 \pm 3,112.6 (140 ~ 12,450)	2,585.3 \pm 2,765.8 (74 ~ 11,042)	0.07
frozen-thawed PBSC n = 16	6,335.1 \pm 6,048.3 (260 ~ 16,050)	6,807.5 \pm 6,627.0 (388 ~ 22,001)	0.39

PB: peripheral blood

PBSC: peripheral blood stem cell

Table 3 Absolute number of CD34+ cells using the single-platform method and two-platform method in a Facs Calibur

Sample	single-platform mean \pm SD ($/\mu\text{l}$) (range)	two-platform mean \pm SD ($/\mu\text{l}$) (range)	P value
PB n = 70	37.5 \pm 40.2 (1 ~ 207)	34.8 \pm 37.4 (1 ~ 183)	0.0004
PBSC n = 28	2,273.3 \pm 2,678.1 (76 ~ 11,411)	2,331.3 \pm 2,631.8 (148 ~ 10,152)	0.79
frozen-thawed PBSC n = 16	6,889.4 \pm 6,626.2 (569 ~ 17,747)	6,361.0 \pm 5,595.2 (176 ~ 15,008)	0.54

PB: peripheral blood

PBSC: peripheral blood stem cell

tomics FC500 と同様に両法間に CD34 陽性細胞数の有意差は認められなかった。

3. 誤差要因の解析

1) Study A :

4 人の術者(末梢血 : 3 人, PBSC : 4 人)が希釈から解析までを行なった場合は、末梢血 (n = 1) では single-platform 法で $109 \pm 12/\mu\text{l}$, two-platform 法で $107 \pm 14/\mu\text{l}$, PBSC (n = 1) では $7,440 \pm 988/\mu\text{l}$, $8,095 \pm 1,006/\mu\text{l}$ であった (Fig. 2)。

希釈済の同一検体を用いて異なる 4 人の術者(末梢血 : 3 人, PBSC : 4 人)が測定と解析をした場合は、末梢血 (n = 1) で $101 \pm 6/\mu\text{l}$, $113 \pm 4/\mu\text{l}$, PBSC (n =

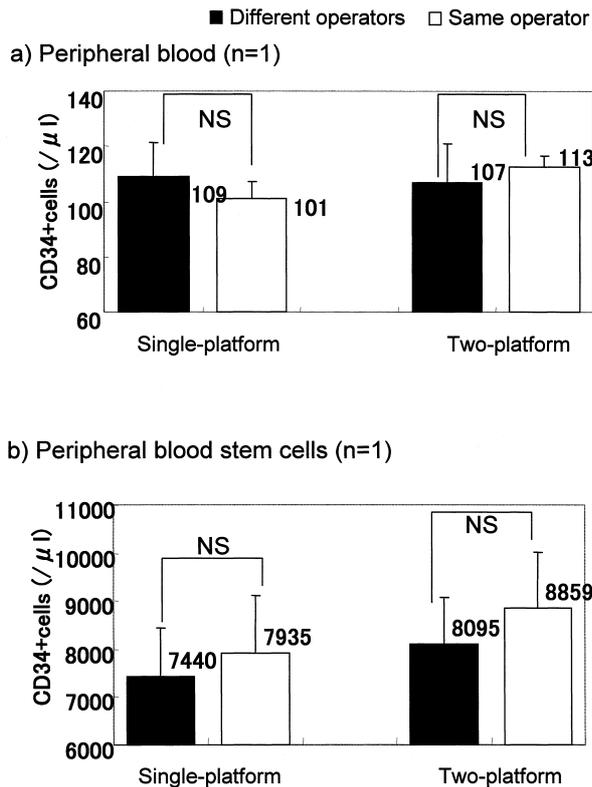


Fig. 2 Effect of errors attributed to pipetting at the dilution of samples on CD34+ cell counts by individual variations in CD34+ cell count among operators.

Different operator: Assays of the full procedure of sample dilution and flow cytometric analysis by four operators.

Same operator: Flow cytometric assays using common diluted samples by four operators.

Assays were conducted using the single-platform and two-platform methods using a Cytomics FC500.

1) で $8,440 \pm 799/\mu\text{l}$, $8,681 \pm 1,351/\mu\text{l}$ であった。

術者が同じでも異なってもその値に single-platform 法, two-platform 法ともに有意差はなかった。

2) Study B :

Trucount Tube を用いた場合 (n=5) の CD34 陽性細胞数は, $4,184 \pm 72.8/\mu\text{l}$ であった (Fig. 3)。

無添加チューブを用いて,最後に Stem-Count を加える通常通りの Stem Kit 法を行なった場合 (n=5) は, $3,540 \pm 461.5/\mu\text{l}$ であった。無添加チューブでの値は Trucount Tube での値より有意に低かった。また, Trucount Tube を用いた場合, ばらつきも少なかった。

考 察

フローサイトメーターによる細胞表面マーカー測定において, CD34 陽性細胞測定は最も一般的な測定であるが, 使用機種や測定プロトコル, 白血球ゲートの設定条件などにより測定値に差が生じることがある¹⁾。そのため, 施設間での測定値の比較が難しいのが現状で

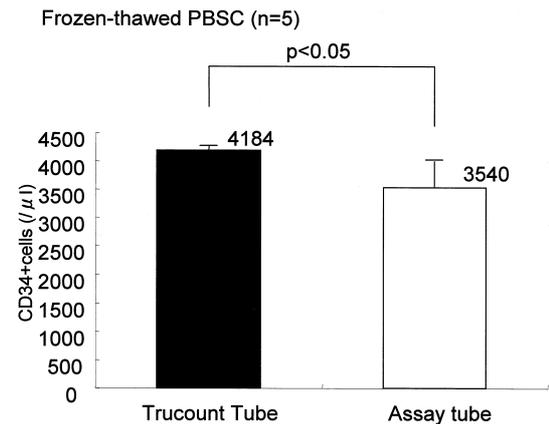


Fig. 3 Effect of errors attributed to pipetting during the addition of beads on CD34+ cell counts.

Trucount Tube: Assay with the addition of beads into a Trucount Tube.

Assay tube: Assay with the addition of beads in a traditional assay tube.

Cytometric analyses were carried out by the single-platform method using a Cytomics FC500 by a single operator.

ある。そこで, 同一検体を用いて異なる測定キット, 異なるフローサイトメーターで CD34 細胞数測定を行ない, 測定値の差について検討した。

CD34 陽性細胞率の比較では, 末梢血, 新鮮 PBSC, 凍結 PBSC とともに両機種間で高い相関を認めた。また, single-platform 法による CD34 陽性細胞数も, サンプルの種類に関わらず両機種間で有意差は認められなかった。故に, 異なる機種間でも CD34 陽性細胞数の比較は可能と考えられた。

また, 各機種による single-platform 法と two-platform 法による CD34 陽性細胞数の比較では, 両機種での末梢血の測定値で two-platform 法の測定値が有意に低かった。このことは two-platform 法により算出した CD34 陽性細胞数を施設間で比較する場合には, 各施設の機種で測定された血算値を乗算するという要因が加わることにより, さらに誤差が大きくなる可能性を示唆している。なお, 今回用いた CD34 陽性細胞率 (%) には BC 法, BD 法ともに, 洗浄による誤差は生じない。

single-platform 法と two-platform 法の間には差はない⁴⁾と報告されている。我々の結果からも PBSC, 解凍 PBSC では差がなかったため, 細胞数が多ければ両法間の差は少なくなると考えられた。Gajkowska ら⁴⁾の研究では陽性細胞数が最も少ない $50/\mu\text{l}$ 以下の検体で CV 値が最も大きかった。

小川は, single-platform 法について, 赤血球算定誤差や白血球ゲートの精度の影響がないため (Pro Count-7AAD (BD) 法), より再現性の良い方法であると述べている⁵⁾。single-platform 法は自動血球計算機での白血

球測定が不要なこと、洗浄・遠心操作による細胞損失の回避ができることが利点として挙げられている²⁾⁶⁾。Fornasら⁷⁾やBarbosaら⁸⁾も誤差要因 (CD34 陽性細胞の測定に白血球測定および染色後の洗浄操作が不要)を減らす為にも single-platform 法の方が優れていると述べている。

塩谷ら⁹⁾も、白血球ゲートの個人差、および施設間差が出ないようにすることが課題であると指摘している。我々の実験結果から、single-platform 法では希釈、およびビーズ添加作業が誤差を大きくする因子と思われた。検体希釈法の統一、ビーズ添加済みキットを用いることなどして測定者間の誤差を少なくすることが施設間差を小さくすることに繋がるのではないかと考える。施設間差を少なくするためには、ISHAGE 推奨法に準拠した操作方法、ピペット操作の習熟、機器の精度管理などが必要である。

今回の結果で、異なる機種でも single-platform 法を用いると良い相関が得られることを示した。

結 語

施設間の測定値の比較には、蛍光検出感度が測定機種により異なることや、操作やゲーティングに個人差が存在することなど、まだ多くの問題が残されている。比較検討において、異なるフローサイトメーター機種でも single-platform 法を用いることにより良好な CD34 陽性細胞数の相関結果が得られた。single-platform 法ではビーズ添加による誤差が結果に強く影響し、末梢血測定において two-platform 法との結果の違いが生じやすいため、Trucount Tube を用いるのが望ましい。

文 献

1) 池本敏行, 竹内 徹, 清水 章: フローサイトメトリー

検査手技の標準化. 臨床病理レビュー特集, 26: 43—48, 2003.

- 2) 芹澤 領, 安武幹智, 斎藤健一, 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: 669—676, 1999.
- 3) 日本臨床検査標準協議会, 血液検査標準化検討委員会, フローサイトメトリーワーキンググループ: フローサイトメトリーによる末梢血リンパ球表面抗原検査に関するガイドライン (H1-PV2.0). 日本臨床検査標準協議会誌, 15: 123—136, 2000.
- 4) Gajkowska A, Oldak T, Jastrzevska M, et al: Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells in leukapheresis product and bone marrow for clinical transplantation: a comparison of three methods. FOLIA HISTOCHEMICA ET CYTOBIOLOGICA, 44: 53—60, 2006.
- 5) 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: 92—98, 2003.
- 6) Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, et al: Single-platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. Cytometry, 34: 61—70, 1998.
- 7) Oscar F, Garcia J, Petriz J, et al: Flow Cytometry counting of CD34+ cells in whole blood. Nature Medicine, 6: 833—836, 2000.
- 8) Barbosa IL, Sousa ME, Godinho MI, et al: Single- versus dual-platform assays for human CD34+ cell enumeration. Cytometry, 38: 274—279, 1999.
- 9) 塩谷美夏, 長村 (井上) 登紀子, 須郷美智子, 他: 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—. 日本輸血学会雑誌, 50: 605—612, 2004.

COMPARISON OF THE NUMBER OF CD34 + CELLS DETECTED WITH TWO COUNT KITS FOR TWO FLOW CYTOMETERS, CYTOMICS FC500 AND FACS CALIBUR

Shunnichi Saito, Miho Okutsu, Yuko Obata, Kinuyo Kawabata, Hiroyasu Yasuda, Kazuhiko Ikeda, Takahiro Kanno and Hitoshi Ohto

Division of Blood Transfusion and Transplantation Immunology, Fukushima Medical University Hospital

Abstract:

Quantitating CD34 antigen-positive (CD34+) cells by flow cytometry is a preferred method for assessing the graft adequacy of peripheral blood stem cell (PBSC) collections. It has been reported that the CD34+ population, however, differs among several counting methods depending on the protocol used. Here, we analyzed a total of 131 samples of peripheral blood (n = 75), PBSC (n = 40) and frozen-thawed PBSC (n = 16) for %CD34+ cells and the absolute number of CD34+ cells using single-platform and two-platform protocols with the Cytomics FC500 and Facs Calibur.

%CD34+ cells showed high correlation coefficients ($R^2 = 0.980$ for peripheral blood, 0.979 for PBSC, and 0.796 for frozen-thawed PBSC) between the Cytomics FC500 and Facs Calibur, and the absolute number of CD34+ cells did not differ between the two machines. For PBSC and frozen-thawed PBSC samples, the absolute number of CD34+ cells correlated well between the single-platform and two-platform methods using the Cytomics FC500 and Facs Calibur. The number of CD34+ cells in peripheral blood detected by the two flow cytometers was, however, higher (Cytomics FC500 : $p = 0.005$, Facs Calibur : $p = 0.0004$) by the two-platform than the single-platform method.

These results show that results for CD34+ cell numbers using the Cytomics FC500 are similar to those with the Facs Calibur when the single-platform method is used. Further, the variation in CD34+ cell count among operators was dependant on errors attributed to pipetting at the dilution of samples or at the addition of beads for CD34+ cell assay. The degree of error attributed to pipetting during dilution with the two-platform and single-platform methods was not significantly different.

Variation in CD34+ cell counts can be reduced by using a single-platform technique in accordance with the International Society of Haematotherapy and Graft Engineering guidelines.

Keywords:

flow cytometry, CD34+ population, single-platform method, two-platform method