Japanese Journal of Transfusion and Cell Therapy, Vol. 63. No. 2　63(2)：126―134, 2017

―【原　著】― Original ―

固定血球を用いた CD34 陽性細胞数測定の外部評価に関する全国多施設共同研究

原口　京子[1)]　奥山　美樹[1)]　高橋　典子[2)]　河原　好絵[3)]　酒井　紫緒[4)]
上村　知恵[5)]　渡邊　直英[5)]　長村―井上登紀子[6)]　高梨美乃子[7)]　上田　恭典[8)]
田野崎隆二[5)]　日本輸血・細胞治療学会細胞治療委員会 CD34 陽性細胞研究グループ

CD34 陽性細胞（CD34$^+$）数は測定法により差が生じるため，欧米ではガイドラインが策定され外部精度評価（EQA）が定期的に実施されているが，国内では測定法も統一されておらず，全国の施設間差の実態は不明であった．今回，日本造血細胞移植学会と日本骨髄バンクの協力を得て，国際的な EQA と同様に，既知の濃度の CD34$^+$を含む固定血球サンプルを配布し測定結果を集計した．対象は自施設で CD34$^+$数測定を行っている 115 施設で，サンプルは市販の陽性コントロール血球（濃度の異なる 2 種類）を使用した．測定値の変動係数（CV）はそれぞれ 18.7% と 24.7% で，外れ値の施設が散見された．各施設にはそれぞれの測定値の標準偏差指標による評価を返送した．測定法に関するアンケート調査も行い，single/dual platform 法がそれぞれ 93/22 施設，ISHAGE ゲート/非 ISHAGE ゲートが 100/15 施設と国際的なガイドラインに準拠した施設が大半であり，これらの施設ではよりバラツキが少なかった．海外では外部精度評価を繰り返すことにより施設間差が減少したと報告されており，調査の継続が必要と考えられた．

キーワード：末梢血幹細胞採取，CD34 陽性細胞，フローサイトメトリー，精度管理，施設間差

末梢血幹細胞移植（PBSCT）は難治性造血器疾患に対する有効な治療法のひとつである．日本骨髄バンク（JMDP）を介した非血縁者間末梢血幹細胞移植の開始から 6 年が経過し，2016 年 10 月現在 94 施設が末梢血幹細胞採取施設として認定されている．PBSCT は，移植片に含まれる幹細胞量の指標となる CD34 陽性細胞（CD34$^+$）数の精確な測定が必須であるが，測定方法や機器により値が異なるとされている[1)~5)]．欧米では 1990 年代から問題視され The International Society of Hematotherapy and Graft Engineering（ISHAGE，現 International Society for Cellular Therapy；ISCT）でガイドラインが出され[6)~9)]（いわゆる ISHAGE ガイドライン），外部精度評価（EQA）とそれに基づくトレーニングで施設間差を縮める努力がなされてきた[10)~13)]．現在 College of American Pathologists(CAP)survey や United Kingdom National External Quality System(UK NEQAS)などで国際的な EQA が行われており日本からも参加できるが，費用が高額で手間がかかるので多くの施設が参加するには現実的ではない．

国内では日本臨床検査標準協議会で近々正式なガイドラインが出される予定であるが[14)]，現時点で JMDP の末梢血幹細胞採取施設認定に CD34$^+$数測定法の条件はない．今後，非血縁者間 PBSCT の増加に加え，海外に末梢血幹細胞採取物を提供する機会も増えると考えられる．国内の CD34$^+$数測定の現状の把握は急務と考えられる．国際的な EQA では，CD34$^+$濃度が既知の血球を固定したサンプルが使用される．同様の固定血球が CD34$^+$数測定の陽性コントロール試薬として市販されており，比較的容易に同一ロットのサンプルが入手できるため，これを用いて EQA を兼ねた調査を行うこととした．なお，本研究は日本造血細胞移植学会と JMDP の協力のもとで行われた．

1）がん・感染症センター都立駒込病院輸血・細胞治療科
2）国立がん研究センター中央病院臨床検査部輸血管理室
3）旭川医科大学病院臨床検査・輸血部
4）千葉大学医学部附属病院輸血・細胞療法部
5）慶應義塾大学病院輸血・細胞療法部
6）東京大学医科学研究所附属病院セルプロセッシング・輸血部
7）日本赤十字社血液事業本部
8）倉敷中央病院，血液内科血液治療センター
〔受付日：2016 年 11 月 6 日，受理日：2017 年 1 月 16 日〕

表 1　測定結果の集計

サンプル	平均値（/μl）	標準偏差（SD）	変動係数（CV %）	中央値（/μl）	最低値（/μl）	最高値（/μl）
A	31.4	5.87	18.7	31	13.44	60
B	13.1	3.28	24.7	13	5.1	34.1

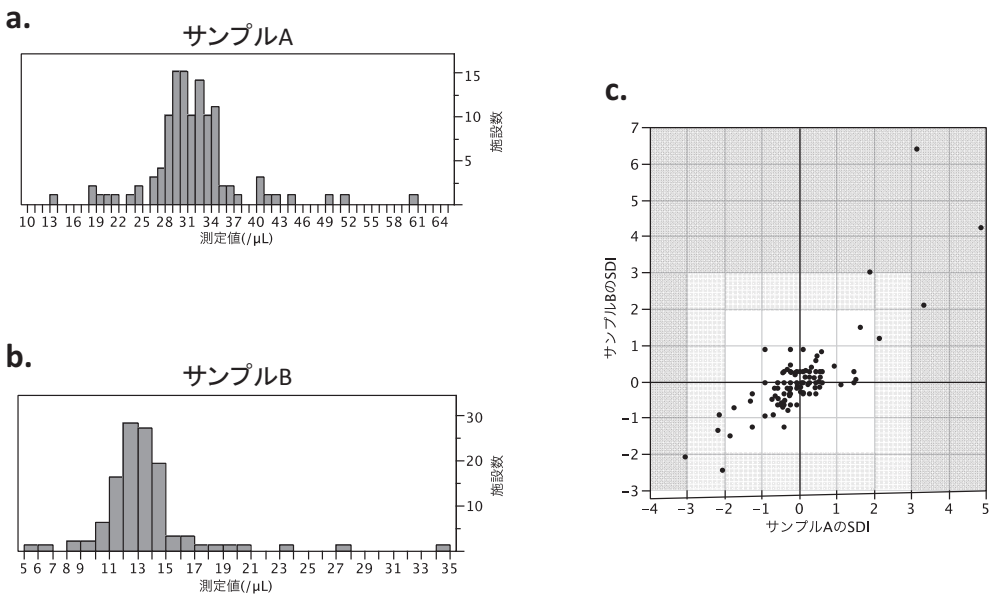

図 1　測定値のヒストグラムと SDI のツインプロット
c. の濃い灰色は SDI 絶対値が 3.0 を超える grade C，薄い灰色は SDI 絶対値が 2.0 を超えて 3.0 以下の grade B，無色が SDI 絶対値が 2.0 以下の grade A

方　　法

研究対象施設基準

末梢血幹細胞採取を行い，自施設で採取物の $CD34^+$ 数を測定している施設（診療科）を対象とした．

倫理事項

配布検体として BD Stem Cell Control（BD Biosciences, CA, USA；保存用培養液に入れたヒトの赤血球，白血球，末梢血 $CD34^+$ を固定した市販品）を使用した．既に連結不可能匿名化され，研究用として広く利用され一般に入手可能な試料・情報であるので，「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」の適用外であり特別な倫理的配慮は必要ない．本研究プロトコールは研究代表者の所属するがん・感染症センター都立駒込病院の倫理委員会，および研究グループ代表者が所属していた国立がん研究センター中央病院院長の承認を受けた．

研究対象施設の選定

日本造血細胞移植データセンター，および各都道府県の大学病院・基幹病院のホームページの情報から，JMDP の同種末梢血幹細胞および骨髄採取認定施設と，その他の PBSCT 施設，合わせて 247 診療科に院内での $CD34^+$ 測定の有無と研究参加諾否を問う予備調査票を送付した．115 診療科が諾，25 診療科が自施設内測定なし，2 診療科から否の回答があり（回答期限を大幅に超えた診療科を除く回答率 57%），諾の 115 診療科を研究対象とした．検体送付後，1 診療科は自施設内で $CD34^+$ 測定を行っていないため脱落し，1 施設はひとつの配布検体をふたつの診療科でそれぞれ測定したため，最終的に 114 施設 115 診療科の参加となった（以下 1 診療科を 1 施設として記載する）．

配布検体準備と送付・測定

BD Stem Cell Control の 1 セット 2 種類の検体をサンプル A，B と名付け，それぞれ 400 ないし 500μl ずつ分注し，保冷剤入り発泡スチロールケースで送付した．使用期限内に通常の方法での測定（ただし死細胞試薬を使用せずに）を依頼し，同時に測定方法に関するアンケートも送付した．結果は生データを解析したプロットシートと共に返送された．

結果の解析と評価

記載データが平均値と 2 桁違った 2 施設は担当者に確認した．そのうちの 1 施設が訂正した値もプロットシートから判断して逆に記載されていると考えられたため，データ解析時に訂正した．5 施設は Dual platform（DP）と single platform（SP）の両方で測定し，それ

表2　測定法に関するアンケート集計

Platform	
Single*1	93
Dual	22
試薬	
キット製品	82
class III PE をもちいた2カラー*2	30
class III FITC をもちいた2カラー*2	2
class III PE の1カラー*3	2
CD34⁺抗体の isotype control も使用	8
ゲート法	
ISHAGE	100
非 ISHAGE	15
メーカー公式の解析ソフトウエアを使用	68
赤血球除去	
非固定	108
固定*4	5
単核球分離	1
不明	1
洗浄回数	
0	99
1	2
2	8
3～5	4
不明	2
死細胞試薬	
7AAD	93
使用しない	20
不明	2
DNA 蛍光色素	
なし	112
不明	3
取り込みイベント数（トータルもしくは CD45⁺で）	
7.5 万以上	98
7.5 万未満	10
その他*5	3
不明	4
陰性コントロール（使用する場合）の使用法	
非特異的結合を引く*6	51
境界を分ける	5
その他・不明	15
複数回測定する施設での最終報告値の計算方法	
平均	61
多い方	4
少ない方	2
採取医判断	1
不明	4
複数回測定する施設で結果に相違があった場合の対処方法	
再検（差が 10% 以上で/15% 以上/20% 以上）	14/6/1
ISHAGE 法の結果を参考にする	1
CD45 陽性イベント数で計算した白血球数が近い方を採用	2
差があっても平均をとる	10
決めていない	26
主治医判断	1
その他・不明	11

*1 普段 Dual platform だが，配布サンプルは single platform で測定した1施設を含む
*2 PE と FITC を併用している1施設を含む
*3 FITC も併用している1施設を含む
*4 自動サンプル調整機器 IMMUNOPREP（Beckman Coulter）使用の2施設を含む
*5 CD34⁺で 500 以上，検体による，等
*6 Stem-Kit（Beckman Coulter）のプロトコール通りと回答の施設も含む

ぞれの結果を記載されたが，通常の検査時に測定している方法（全施設が DP）を採用した．

全施設の平均値，標準偏差（SD），変動係数（CV），中央値，最低値，最高値を算出した．各施設の評価は EQA で使用されることの多い標準偏差指数（standard deviation index，SDI，または Z スコア）[15] を使用した．＋2.0 から－2.0 の場合は grade A，絶対値が 2.0 を超えて 3.0 以下の場合は grade B，3.0 を超える場合は grade C の評価をつけ各施設へ送付した．Grade C の場合はフローサイトメーターのメーカーサービス担当者に相談することを勧める文書を添えた．

結　果

測定結果集計

表1に集計値を，図1にそれぞれの測定値のヒストグラムと SDI のツインプロット図を示した．平均値と中央値はほぼ同一で，正規分布であることを確認した（データ示さず）．

測定法のアンケート結果

表2に測定法に関するアンケート集計を示す．Platform は推奨されている SP の施設が多かった．DP のうち3施設は，SP の試薬を使用して測定し，DP で結果を算出していた．

ゲート法は ISHAGE ゲートの施設が多かった．非 ISHAGE のうち7施設は Bender ゲート[12)16)]，2施設は Milan ゲート[12)17)18)] と回答したが，プロットシートから判断するとそのうち2施設と1施設は独自のゲート法であった．

Isotype control 使用施設が8施設あった．そのうち，ISHAGE ゲートでゲーティングしている施設が2施設あった．（ISHAGE ゲートでゲーティングする際は Isotype control の使用は推奨されていない[9)19)]．一部のキットに同梱される陰性コントロールは Isotype ではなく Isoclonic control である．）

赤血球除去は，いわゆる ISHAGE ガイドライン通り，非固定の溶血剤を使用し，洗浄なしの施設が大半であったが，CD34⁺測定キット使用にもかかわらず固定剤入りの溶血剤を使用していると回答した施設が1施設あった．固定あり・洗浄なしの自動サンプル調整機器を使用した施設が2施設（ただし1施設は洗浄を加えていた），単核球分離を行っている施設が1施設あった．洗浄回数が3回以上の施設も複数存在した．

CD34⁺測定キットには duplicate で測定するプロトコールのものがあるが，single で測定するプロトコールのキットを使用した施設といずれのキットも使用していない施設が合わせて 60 施設あり，そのうちの 19 施設でも複数回測定をしていた（データ示さず）．しかし，複数回測定で相違が出た場合のデータの扱い方を明確にし

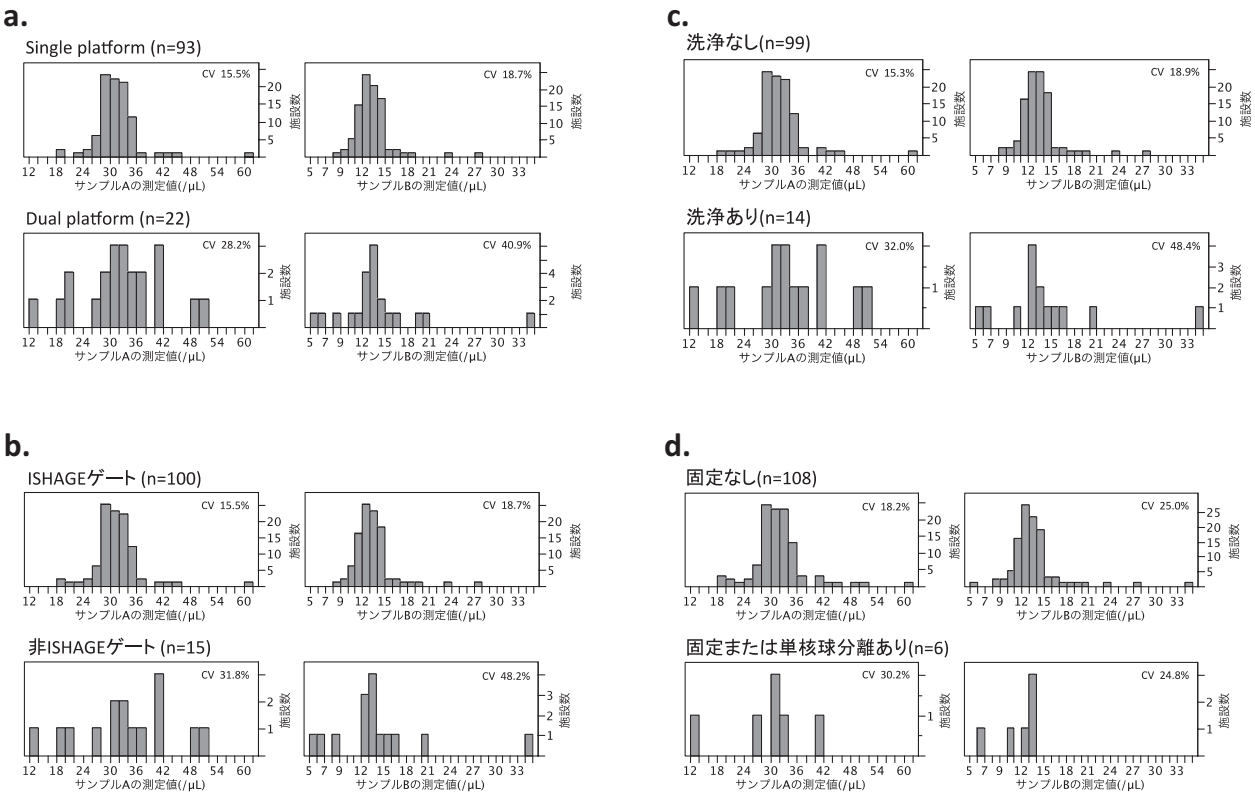

図 2　方法別の測定値のヒストグラム

a. Platform，b. ゲート法，c. 洗浄の有無，d. 赤血球除去法，における各方法別のヒストグラム．それぞれ上方がいわゆる ISHAGE ガイドラインで推奨されている方法

ていない施設も多かった．

方法別の測定結果

図 2 に方法別の測定値のヒストグラムを示す．施設数に偏りがあるが，いずれもいわゆる ISHAGE ガイドラインで推奨されていない方法は CV が高かった．

図 3 は SP で測定の施設中，CD34$^+$測定キット使用の有無，専用解析ソフトウエア使用の有無別のヒストグラムを示す．専用試薬やソフトウエアを使用した方が低い CV であった．

検査の実態に関するアンケート集計

表 3 に各施設の品質管理について示す．機器の定期メンテナンスや CD34$^+$の精度管理は半数以上で行われているが，行わない施設も少なくなかった．CD34$^+$測定値に対しては，外部（検査会社含む）との比較を行ったり，複数のオペレーターで確認したり，CD45$^+$から白血球数を計算するなど異なる計算方法を組み合わせたりと，何らかの検証を行ったことのある施設も多く，そのような施設は何もしていない施設より CV が低かった（図 4）．

表 4 に各施設の検査状況を示す．検査件数は，月 5 件までが全体の 2/3 を占めていた．測定を行っている職種は圧倒的に臨床検査技師が多く，部署は輸血部門と血液検査部門で半々であった．しかし，研究室で技術職員や医師が行っている施設も少数存在した．

JMDP 認定施設の測定結果

図 5 に示す．末梢血幹細胞採取認定施設の方が CV は低いものの，2 施設は評価が grade C，1 施設が grade B であった．

考　　察

本邦初の全国規模での CD34$^+$測定の EQA を行った．2014 年に輸血・細胞治療学会の血液製剤使用実態調査で CD34$^+$測定に関してはじめて質問が設けられ，SP や ISHAGE ゲートで測定している施設がそれぞれ 8 割を超えていた[20]．一方，最近の施設間差の研究では，参加 5 施設のうち 4 施設が DP で測定していたが，その割に 1 施設を除いて差が少なかった[5]．経験豊富な少数施設のデータのため全国的な傾向は反映されず，今回の研究ではじめて国内の実態が明らかになった．なお，最初の EQA として，評価は測定値のみで行い，方法の正誤の評価は返送しなかった．また，測定原理に詳しくない検査者には答えにくいアンケート項目もあり，不明瞭な回答についても追加調査せずに集計し，不十分な点はプロットシートから補完した．

測定法が標準化されていない現在の状況は 1990 年代中頃の欧米と似ていると考えられる．この頃の CD34$^+$

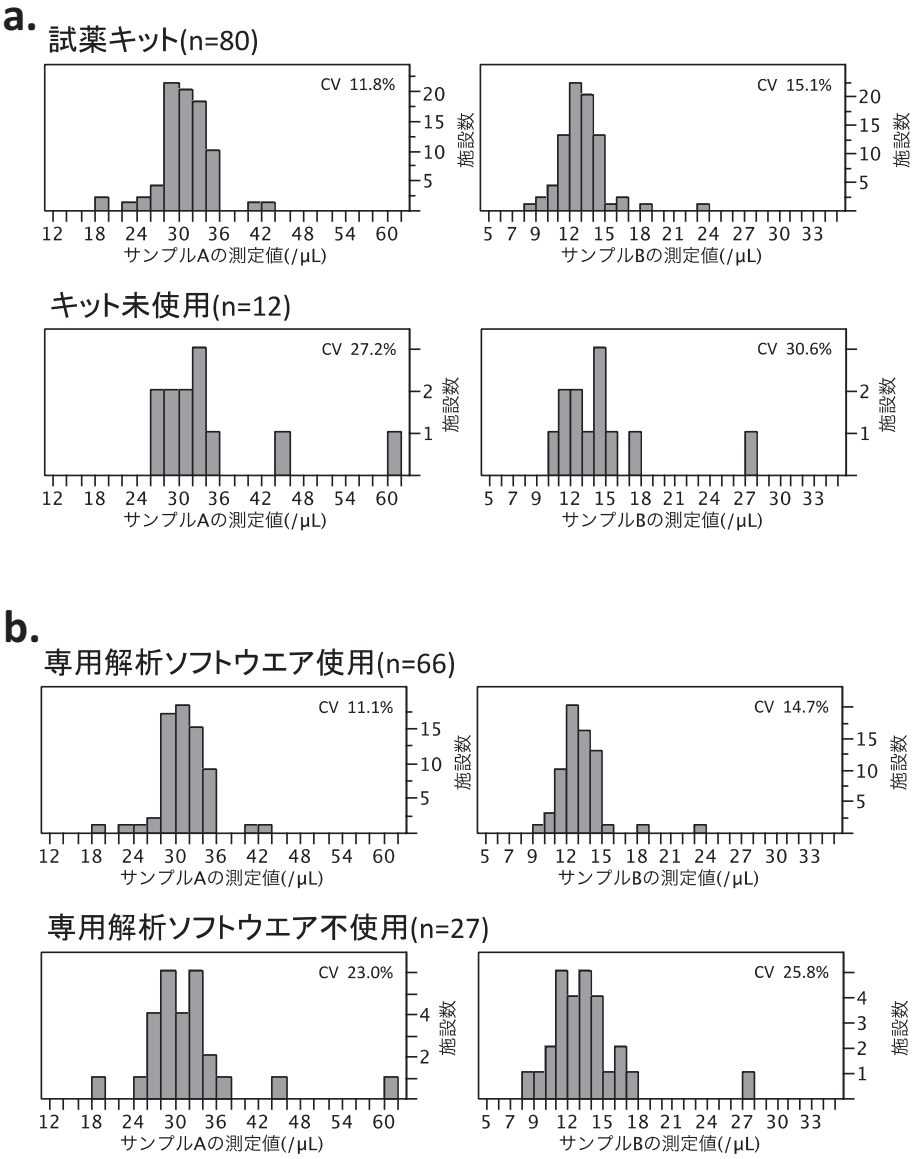

図 3　Single platform 施設における試薬・解析法別の測定値のヒストグラム
Single platform を併用しつつ，Dual platform で最終値を算出している施設は除く
a. 測定キット種類不明の 1 施設を除く
b. 専用解析ソフトウエア使用の施設はすべて CD34⁺測定キットを使用していた

測定施設間差の研究では，CV が 20〜100% 程度のものが多く[7]，これと比べると今回の調査は比較的バラツキが小さかったと言える．いわゆる ISHAGE ガイドラインの方法で測定した施設が多かったためと考えられる．

いわゆる ISHAGE ガイドラインの測定法，すなわち，SP，ISHAGE ゲート，非固定の溶血剤の使用，洗浄なしで測定した施設の CV が低く，特に CD34⁺測定キットをもちいて，専用解析ソフトウエアを使用した施設が最も CV が低かった（図 3b）．他の方法でも正しい値の施設は少なくはない．実際，複数の方法で検証を行った DP の 10 施設の CV（サンプル A；19%，サンプル B；14%）は，結果の検証を何もしていない SP の 31 施設（同 20%，22%）より低い．DP から SP に変更しない理由として，DP でも値は正しい，ビーズ分注の精確性や検体希釈に伴う計算を考えると SP が信用できるとは言えない，と答えている施設もある（表 4）．それでも注意深く測定した DP の CV は SP 全体（図 2）よりも高く，標準的な方法で測定しなくてもよい根拠とはならないと考えられた．

独自のゲート法を行った施設のうち，5 施設は CD34⁺や白血球分画のゲートが明らかに間違っていた．具体的には，CD34⁺をヒストグラムや 4 分割でゲーティングしたり，CD34⁺と CD45⁺（白血球分画）を異なるサンプルチューブで測定したり，白血球分画が異なっていたりした．ところが，5 施設のうち 2 施設は grade A で SDI の絶対値が 1 以下と，見かけ上は高評価であっ

た.

評価の低い別の2施設は計算間違いと思われた．1施設はCD45⁺イベント数から計算した白血球数が2倍で,1施設はプロットシート上は正しい値に思われたが最終値が異なっていた.計算方法の記載を求めなかったため，ミスの原因は不明であった.

ゲーティングがずれてCD34⁺ゲートの中に明らかにリンパ球が混入してgrade Cの施設があった．階層化

表3　品質管理に関するアンケート集計

機種	
FACSCantoII/FACSCanto/FACSCalibur/FACSVerse	30/1/16/1
Navios/Cytomics FC500/EPICS XL/XL-MCL	34/30/2
MoFloXDP	1
Singleの場合の値の確認の有無	
CD45⁺から白血球数を計算	37
Dualでも計算	3
なし	50
その他・不明	3
機器メンテ	
定期メンテ	66
その他（ビーズで安定性の確認等）	33
なし	14
不明	2
CD34⁺の精度管理	
あり	76
複数のオペレーターで確認	2
なし	37
外部と比較	
あり*	36
自施設内で確認のみ	8
なし	70
不明	1

*検査会社の測定値と比較の24施設含む

表4　検査状況に関するアンケート集計

検査件数	
月1件	33
月5件まで	44
月5件～年100件	27
年100件以上	11
検査部署	
輸血部門*1	53
血液検査部門*1	54
その他の検査部（血清，遺伝子）	7
細胞治療室	1
研究室	3
検査担当者職種	
臨床検査技師*2*3	111
医師*2*3	9
実験助手・技術職員*3	2
検査担当者資格*4	
認定輸血検査技師	44
認定血液検査技師	38
輸血認定医	6
認定フローサイトメトリー技術者	17
その他	5
Single platformで測定しない理由	
Dual platformでも正しい	6
コストがかかる	12
試薬の期限が短い	1
過去データとの整合性に問題	5
採用試薬の変更手続きが手間	2
精度に疑問（ビーズの分注，検体希釈）	2
医師の都合・医師から要請がない	2
考えていなかった	1

*1 輸血部門か血液検査部門のどちらかで検査の3施設を含む
*2 臨床検査技師または医師の5施設を含む
*3 臨床検査技師または医師または技術職員の1施設含む
*4 細胞治療認定管理師は新設のためアンケートの選択肢に含めなかったため集計せず

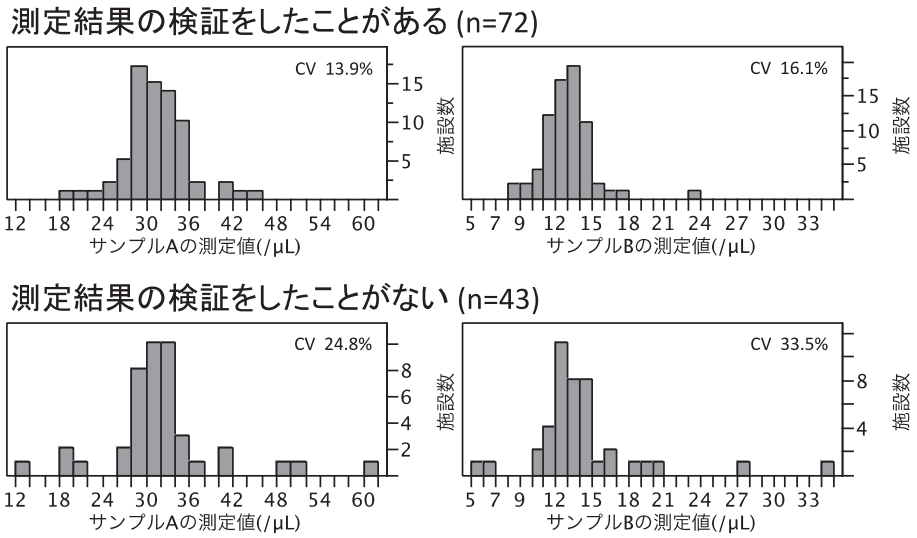

図4　測定結果検証経験の有無により群別した測定値のヒストグラム
外部と比較したことがある，複数の方法や検査者で比較したことがある，測定値を複数の計算方法で確認している，のいずれかに当てはまる施設を測定結果の検証をしたことがある施設とした.

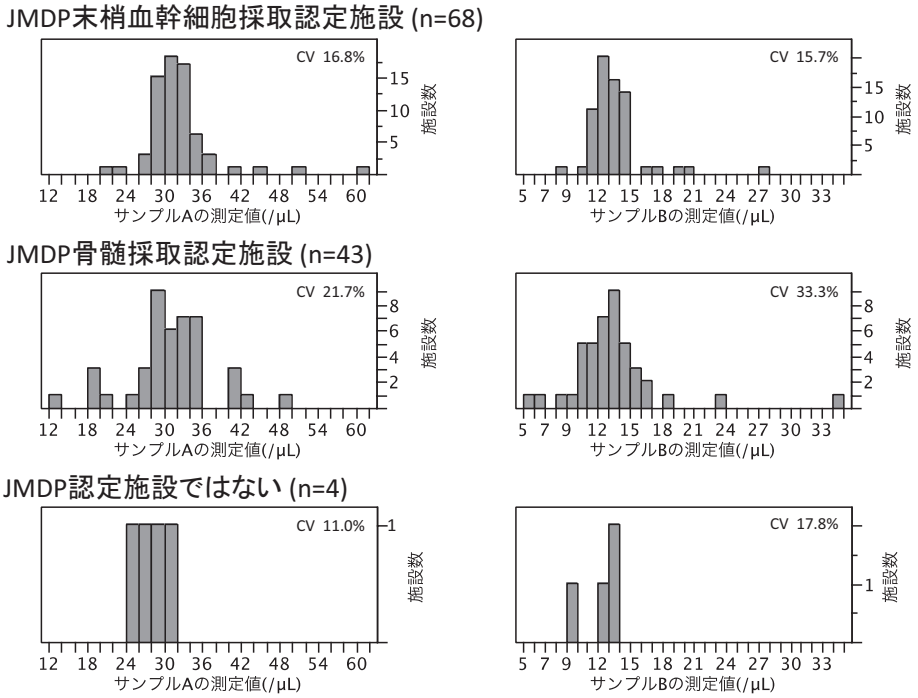

図 5　JMDP 認定の種類別により群別した測定値のヒストグラム

論理ゲーティングでは結果に影響しにくいと考えられるが，ゲーティングのずれは多くの施設で認められ，ずれがないと判断できたのは 21 施設のみであった. 特に，使用しない 7AAD のゲートが残されていたため，少数のイベントがカウントから外れていた施設が 55 施設あった．また，ISHAGE ゲートの際，CD45/SSC のプロット図でリンパ球集団にゲートをし, これを FSC/SSC で展開してこの集団にあてたゲートを $CD34^{+}CD45^{dim}$ 集団の FSC/SSC 展開図にコピーして $CD34^{+}$ とするステップに何らかの間違いがある施設が 52 施設もあった. 海外の EQA でも間違いが多い箇所と報告されており[13] 注意が必要と考えられる．なお，自動ゲーティング機能のついたソフトウエア使用 65 施設は大きな間違いは少ないものの, 11 施設は必要に応じて手動でゲートを調整し直す作業をしていないと答えており，適切な指導が必要と考えられた.

サンプルが固定血球であることによる問題点もある. FITC 標識抗ヒト CD34 class III 抗体の染色性が生サンプルと異なり陽性と陰性の分離が不良であったという. このため普段 DP のシングルカラーで測定している 1 施設は，本研究サンプルは SP で測定し直した．一方，固定血球では遠心を繰り返しても $CD34^{+}$ は失われず，生サンプルだと外れた値を出す施設の成績が良かった可能性もある[4]. 自施設検体を検査会社にも提出して比較するなど，生検体での検証で補完する必要があると考えられる.

JMDP の末梢血幹細胞採取認定施設にも外れ値の施設が複数存在し，何らかの対策が求められる．一方，今後の EQA 継続の希望や今回不参加施設の次回参加希望が寄せられている．今回の結果で測定法の変更を検討するという施設もある．参加施設の増加と結果の改善が期待され, もう一度同様の研究を行う予定でいる. 海外では EQA を繰り返すことにより施設間差が減少したと報告されている[12]．将来的には，国内で定期的に EQA を行う体制を作り, JMDP の末梢血幹細胞採取施設認定の条件にできれば，日本の造血幹細胞移植医療の発展に寄与すると考えられる.

著者の COI 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

謝辞：本研究は, 日本医療研究開発機構　免疫アレルギー疾患等実用化研究事業（移植医療技術開発研究分野）「造血幹細胞移植に用いる細胞の安全な処理・保存・品質管理体制の確立に関する研究」の研究費支援を得た．なお，本研究遂行に際し，日本ベクトン・ディッキンソン株式会社およびベックマン・コールター株式会社に技術指導等を受けた.

文　献

1）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―. 日本輸血細胞治療学会誌, 50：605―612, 2004.

2）斎藤　俊，奥津　美，小幡　悠，他：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陽性細胞数測定の比較：Cytomics FC500とFacs Calibur．日本輸血細胞治療学会誌，53：547―552, 2007.
3）Ngoma A, Saito S, Ohto H, et al: CD34+ Cell Enumeration by Flow Cytometry: A Comparison of Systems and Methodologies. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 135: 909―914, 2011.
4）原口京子，奥山美樹，田野崎隆二，他：CD34陽性細胞測定における施設間差の検討．日本輸血細胞治療学会誌，62：32―40, 2016.
5）原口京子，奥山美樹，吉田茂久，他：CD34陽性細胞数定量の施設間差に関する検討．日本輸血細胞治療学会誌，61：240, 2015.
6）Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, et al: The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother, 5: 213―226, 1996.
7）Gratama JW, Orfao A, Barnett D, et al: Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. Cytometry, 34: 128―142, 1998.
8）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.
9）Sutherland DR, Keeney M, Gratama JW: Enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. Current Protocols in Cytometry, Chapter 6: Unit 6, 4, 2003.
10）Barnett D, Granger V, Kraan J, et al: Reduction of intra- and interlaboratory variation in CD34+ stem cell enumeration using stable test material, standard protocols and targeted training. British Journal of Haematology, 108: 784―792, 2000.
11）Gratama JW, Kraan J, Keeney M, et al: Validation of the single-platform ISHAGE method for CD34 (+) hematopoietic stem and progenitor cell enumeration in an international multicenter study. Cytotherapy, 5: 55―65, 2003.
12）Levering WH, Preijers FW, van Wieringen WN, et al: Flow cytometric CD34+ stem cell enumeration: Lessons from nine years' external quality assessment within the Benelux countries. Cytometry Part B Clinical Cytometry, 72B: 178―188, 2007.
13）Whitby A, Whitby L, Fletcher M, et al: ISHAGE protocol: Are we doing it correctly? Cytometry Part B Clinical Cytometry, 82B: 9―17, 2012.
14）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CD34陽性細胞検出に関するガイドライン（JCCLS H3-P V2.0）．http://jccls.org/techreport/Guidelines_for_CD34a.pdf（2016年11月現在）
15）日本臨床衛生検査技師会精度管理調査評価法検討・試料検討ワーキンググループ：臨床検査精度管理調査の定量検査評価法と試料に関する日臨技指針．医学検査，57：109―117, 2008.
16）Bender J, Unverzagt K, Walker D: Guidelines for determination of CD34+ cells by flow cytometry: Application to the harvesting and transplantation of peripheral blood stem cells, In: Wunder E, Sovalat H, Henon P, eds, Hematopoietic Stem Cells. The Mulhouse Manual, Alpha Med Press, Dayton, 1994, 31―34.
17）Siena S, Bregni M, Brando B, et al: Flow cytometry to estimate circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation: comparative analysis of different CD34 monoclonal antibodies. Haematologica, 76: 330―333, 1991.
18）Siena S, Bregni M, Di Nicola M: Milan protocol for clinical CD34+ cell estimation in pheripheral blood for autografting in patients with cancer, In: Wunder E, Sovalat H, Henon P, eds, Hematopoietic Stem Cells: The Mulhouse Manual, AlphaMed Press, Dayton, 1994, 23―30.
19）Keeney M, Gratama JW, Chin-Yee IH, et al: Isotype controls in the analysis of lymphocytes and CD34+ stem and progenitor cells by flow cytometry-time to let go? Cytometry, 34: 280―283, 1998.
20）一般社団法人日本輸血・細胞治療学会：平成26年度血液製剤使用実態調査データ集．http://yuketsu.jstmct.or.jp/wp-content/themes/jstmct/images/medical/file/comprehensive_investigation/Qusttionnaire2014_Basic.pdf（2016年11月現在）

THE FIRST NATIONWIDE EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT OF CD34$^+$ CELL ENUMERATION IN JAPAN

Kyoko Haraguchi[1], Yoshiki Okuyama[1], Noriko Takahashi[2], Yoshie Kawahara[3], Shio Sakai[4], Tomoe Uemura[5], Naohide Watanabe[5], Tokiko Nagamura-Inoue[6], Minoko Takanashi[7], Yasunori Ueda[8], Ryuji Tanosaki[5] and CD34$^+$ Cell Study Group, Cell Therapy Committee, The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy

[1] Division of Transfusion and Cell Therapy, Tokyo Metropolitan Cancer and Infectious Diseases Center Komagome Hospital

[2] Department of Clinical Laboratories, National Cancer Center Hospital

[3] Division of Medical Laboratory and Blood Center, Asahikawa Medical University Hospital

[4] Department of Transfusion Medicine and Cell Therapy, Chiba University Hospital

[5] Center for Transfusion Medicine and Cell Therapy, Keio University Hospital

[6] Department of Cell Processing and Transfusion, IMSUT Hospital, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

[7] Japanese Red Cross Society, Blood Service Headquarters

[8] Department of Hematology/Oncology, Transfusion and Hemapheresis Center, Kurashiki Central Hospital

Abstract:

To reduce the unacceptably high variation associated with enumeration of CD34$^+$ cells, international guidelines have been formulated and periodic external quality assessment (EQA) programs have been implemented in Europe and the USA. In Japan, a variety of flow cytometric methods are used for CD34$^+$ cell enumeration due to a lack of standardization. Since no data are available regarding the degree of measurement variability in Japan, we performed an EQA of CD34$^+$ cell enumeration for the first time. 115 laboratories across Japan that routinely enumerate CD34$^+$ cells participated in this program. Two commercially available, stabilized, whole blood CD34$^+$ samples were used. Coefficients of variation of the measurements were 18.7 and 24.7%, and some outliers were found. We used the standard deviation index to evaluate each laboratory. Each laboratory was also requested to provide related methodology details by completing a questionnaire. The number of single/dual platform methodology users was 93/22, and the number of ISHAGE/non-ISHAGE gating strategy users was 100/15. Many participants used the international standard methods, and their results showed less variation. Repeated external quality assessment has been reported to reduce the inter-laboratory variation and promote standardization of CD34$^+$ cell enumeration. Therefore, it is extremely important to continue this survey.

Keywords:

Peripheral blood stem cell harvest, CD34$^+$ cell, Flow cytometry, Quality control, Inter-laboratory variation

©2017 The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy

Journal Web Site: http://yuketsu.jstmct.or.jp/