

CD34 陽性細胞測定法の比較検討

大木 浩子 今井 厚子 野呂 光恵 植松 正将 阿南 昌弘
山本 晃士 田坂 大象

CD34 陽性細胞数の測定において、従来行われてきたデュアルプラットフォーム法 (DP 法) からシングルプラットフォーム法 (SP 法) への移行に伴い、両法の比較検討を行った。末梢血幹細胞採取 (PBSC) 患者 18 症例 68 検体のうち、末梢血検体 48 検体における CD34 陽性細胞数の相関係数は 0.997、PBSC 検体 20 検体における CD34 陽性細胞数の相関係数は 0.985 と良好であり、DP 法と SP 法で有意差は認められなかった。SP 法はフローサイトメトリーだけで測定できるため検査の精度が高く、測定時間も SP 法約 40 分、DP 法約 2 時間と SP 法の方が短時間である。以上のことから、SP 法は PBSC 時の採取時期、採取量の決定に際して、より有用であると考えられた。

キーワード：CD34 陽性細胞数測定、デュアルプラットフォーム法、シングルプラットフォーム法

はじめに

ヒトの造血幹細胞の指標である CD34 陽性細胞 (CD34⁺) 数は造血幹細胞移植後の生着に重要であり、末梢血幹細胞採取 (PBSC) の際は採取時期、採取量の決定に CD34⁺ 数の測定が重要である。CD34⁺ 数の測定方法には、CD34⁺ 率に白血球数を乗算して算出する Dual platform 法 (DP 法) と、国際血液療法・移植学会 (ISHAGE) ガイドラインで推奨されている、絶対値測定用ビーズを用いた Single platform 法 (SP 法)¹⁾ があるが、国内では標準化されておらず、施設間差の存在が懸念されている²⁾³⁾。以上の点を踏まえ、同一検体を用いて、DP 法と SP 法による CD34⁺ 数の測定について比較検討を行ったので報告する。なおこの研究は、本学 IRB の承認を得た上で進んでいる。

対象と方法

2015 年 10 月から 2016 年 12 月までに化学療法併用ないし G-CSF 単独で幹細胞を動員した PBSC 患者 18 症例を対象とした。当院での PBSC は、全例 Spectra Optia[®] (Terumo BCT) を使用し、MNC モードにて行っている。DP 法では、比重遠心法で単核細胞に分離後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄、FITC 標識 CD34 モノクローナル抗体 (ベクトンディッキンソン社：BD 社) を加え、その後フローサイトメトリーで CD34⁺ 率を測定した (所要時間約 2 時間)。CD34⁺ 数は、別途得られた白血球数を乗じて算出した⁴⁾。測定は、習熟した専任者 1 名が行った。SP 法は、BD Stem Cell Enumera-

tion Kit (BD 社) を用い、TruCOUNT チューブに BD SCE (CD34 PE/CD45 FITC) 抗体と死細胞除去のための 7-AAD を添加した後、検体を添加した。一定時間反応後、溶血剤を添加し、フローサイトメトリーにて測定を行った (所要時間約 40 分)。CD34⁺ 数は、内部標準イベント数の比例計算により求めた⁵⁾。測定は複数の技師が交代で行った。いずれもフローサイトメトリーには、FACSCalibur (ベクトンディッキンソン社) を用いた。同一検体を用いて CD34⁺ 数の測定を行い、DP 法と SP 法の相関性を検討した。また、PBSC を行った症例においては、採取開始時の末梢血と採取バッグ内の CD34⁺ 数の相関について検討した。

結 果

全 18 症例 (自家 15 症例、同種 3 症例) から、末梢血 48 検体、末梢血幹細胞採取バッグ (PBSC) 20 検体が得られた。末梢血検体、PBSC 検体の CD34⁺ 数は、いずれの検体においても測定法による差がなく、DP 法と SP 法の相関係数は末梢血検体で 0.997、PBSC 検体で 0.985 であり、いずれにおいても有意差は認められなかった (表)。採取開始時の末梢血と PBSC 検体における CD34⁺ の相関係数は、DP 法では 0.850、SP 法では 0.892 であった (図)。

考 察

CD34⁺ 数の測定において、DP 法は SP 法より変動係数が大きく³⁾、洗浄などの操作に伴い細胞数が減少する

表 DP法とSP法におけるCD34陽性細胞数の相関

検体数	CD34陽性細胞数 (/μL)		p値*	回帰式 (相関係数)
	DP法 (x) 平均値±SD (範囲)	SP法 (y) 平均値±SD (範囲)		
末梢血検体	48	99.6±161.7 (1~774)	0.82	$y = 1.089x - 0.77$ (0.997)
PBSC検体	20	3,547.1±3,287.2 (46~10,658)	0.97	$y = 0.961x + 177.07$ (0.985)

*対応のない2群間のt検定による

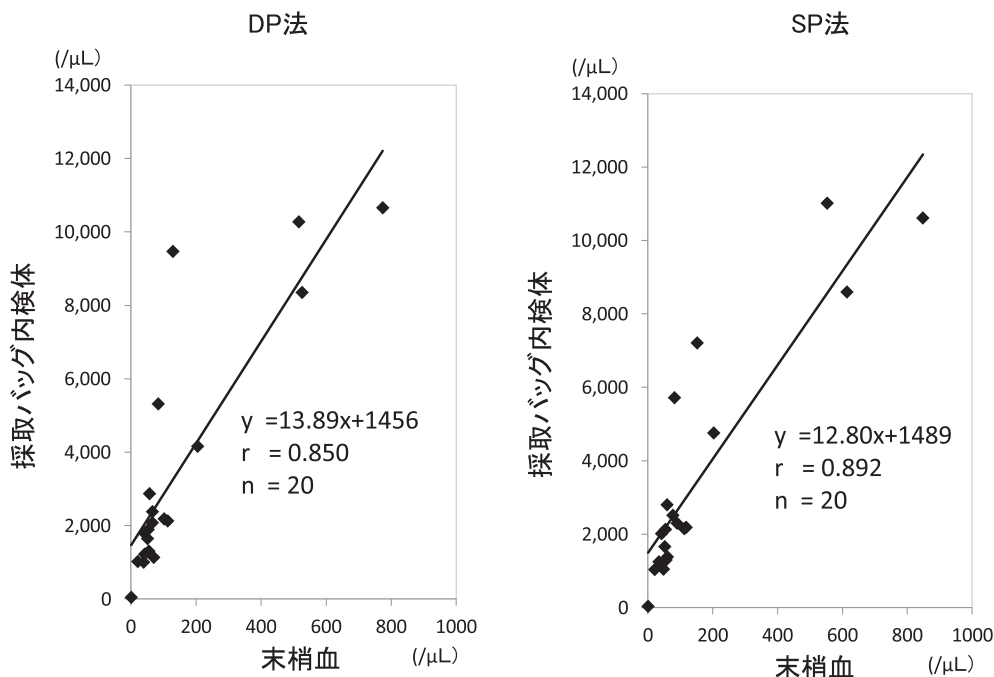


図 採取開始時の末梢血と採取バッグのCD34陽性細胞数の相関

ことが報告されている²⁶⁾。今回の検討でDP法とSP法の相関が良好であったのは、当院ではDP法の単核球分離を比重遠心法で行っているため、洗浄などの操作時に細胞数の減少が少なかったのが理由ではないかと考えられる⁷⁸⁾。昨今、施設間の測定誤差が指摘されているが、その点は今後、非血縁者間末梢血幹細胞移植の際にも問題となるため、ガイドラインで推奨されているSP法を導入することが望ましいと考えられる。一方、採取開始時の末梢血CD34⁺数はPBSC検体と良好な相関を示しており、造血幹細胞の採取時期の決定と採取量の予測に有用であることが確認された⁹⁾。最近、造血幹細胞を末梢血中に動員する新規薬剤 plerixafor が使用可能となった。plerixafor は造血幹細胞が従来法では十分動員されない患者に対してでも有用とされるが、高価薬であり、投与決定にはCD34⁺数の迅速かつ簡便な測定が望まれる¹⁰⁾。SP法は測定時間が短く、フローサイトメトリーだけで測定できるため検査の精度が高い。また、測定者間の誤差も少ないと考えられる。以上のことから、SP法の導入はより効率的なPBSCHに寄与できる可能性があると考えられた。

著者のCOI開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文 献

- 1) 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-A V2.0), 2016.
- 2) 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.
- 3) 原口京子, 奥山美樹, 高橋典子, 他: 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. 日本輸血細胞治療学会誌, 63: 126-134, 2017.
- 4) 鈴木康文, 木村昌行, 諏訪多順二, 他: 末梢血CD34陽性細胞測定値の信頼性についての検討. Biotherapy, 10: 1527-1531, 1996.
- 5) 廣瀬弥保, 田中 聡, 富山宏子: Stem Cell Enumeration (SCE) Kitを用いたCD34陽性細胞の測定. Cytometry Research, 22: 13-18, 2012.

- 6) Menéndez 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 CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Cytometry*, 34: 264—271, 1998.
- 7) 小川恵津子：フローサイト法による CD34+ 細胞測定. 日本検査血液学会雑誌, 4 : 92—98, 2003.
- 8) Naithani R, Dayal N, Dixit G: Single versus dual platform analysis for hematopoietic stem cell enumeration using ISHAGE protocol. *Indian J Hematol Blood Transfus*, 33: 370—374, 2017.
- 9) D'Arena G, Musto P, Di Mauro L, et al: Predictive parameters for mobilized peripheral blood CD34+ progenitor cell collection in patients with hematological malignancies. *Am J Hematol*, 58: 255—262, 1998.
- 10) Abusin GA, Abu-Arja RF, Gingrich RD, et al: An algorithm for utilizing peripheral blood CD34 count as a predictor of the need for plerixafor in autologous stem cell mobilization—cost-effectiveness analysis. *J Clin Apher*, 28: 293—300, 2013.

COMPARISON OF SINGLE VERSUS DUAL PLATFORM ANALYSIS IN ESTIMATING CD34-POSITIVE CELL COUNT

Hiroko Oki, Atsuko Imai, Mitsue Noro, Seisyo Uematsu, Masahiro Anan, Koji Yamamoto and Taizo Tasaka
Department of Transfusion Medicine and Cell Therapy, Saitama Medical Center, Saitama Medical University

Abstract:

Accurate estimation of CD34-positive cell count is important for predicting engraftment in peripheral blood stem cell (PBSC) transplantation. We evaluated two methods of counting CD34-positive cells—dual platform (DP) and single platform (SP) analyses. Samples were obtained from patients who were scheduled to undergo PBSC harvest. SP and DP analyses yielded similar results, with a strong correlation coefficient value greater than 0.98 for peripheral blood (PB) and PBSC samples. SP has the advantage of a shorter time (i.e., 40 minutes) to perform and higher accuracy than DP. Accordingly, SP is more useful in determining the timing and volume of PBSC harvest.

Keywords:

CD34-positive cell count, dual platform analysis, single platform analysis