

## 技 術

# フローサイトメトリーによる 骨髄造血幹細胞定量検査について

佐々木 淳 船木 千春 長谷川 智  
下山 則彦

## Quantitative Analysis of Bone Marrow Hematogenous Stem Cell by Flow Cytometry

Jun SASAKI, Chiharu FUNAKI, Satoshi HASEGAWA  
Norihiko SHIMOYAMA

Key words : Flow cytometry CD34  
StemCell Transplantation

### はじめに

市立函館病院では2001年8月・12月に2件の血縁ドナー同種骨髄移植が行われ、引き続き同種末梢血幹細胞移植の予定が立てられている。

造血幹細胞移植においては、CD34陽性細胞数は比較的簡便に測定されるので移植の成否に関わる直接的指標として臨床的に重視されている。

しかし現状はその測定値は施設間で差があり標準化に向けて努力がなされている段階である。

著者らは、関連学会のガイドラインに沿ってStem-kitを使用することによって骨髄穿刺液からのCD34陽性造血幹細胞絶対数測定を行っているので、その実際につい

て報告する。

### 測定機器および方法

当院ではフローサイトメトリー（以下FCM）検査機器として、BECKMAN COULTER社 EPICSが導入され、CD34陽性細胞測定キット Stem-kitを使用しCD34陽性細胞数を測定している。

### 測定方法(表1)

- ①PE (phycoerythrin) 及び FITC (fluorescein isothiocyanate) 標識細胞を検体（細胞）と反応させる
- ②生細胞のみを測定できる操作を行う（7-AAD [7-

表1 CD34陽性細胞絶対数測定チューブ作成行程（分注単位はμl）

	Set Up Tube			Test Tube		
	Flow Set	COMP	TROL	test 1	test 2	CTRL
Flow-Set Fluorosperes	500					
CD8-TITC/CD4-PE		20				
CD45-FITC/CD34-PE			20	20	20	
CD45-FITC/CTRL-PE						20
Stem Trol Control Cells		20	20			
新鮮正常血液		100	100			
検体*				100	100	100
7-AAD Viability Dye		20	20	20	20	20
1 × NH4 Cl lysing reagent		2000	2000	2000	2000	2000
Stem-Count			100	100	100	100

\*検体はWBCを1万/μl程度に調整する

amino-actinomycin D]での生死判定) ③溶血操作 (NH<sub>4</sub>Cl) ④測定誤差の減少作業 (Stem-Count) ⑤測定, の順で行われる。測定時間は検体の細胞数によって2~6分を要し, 細胞数が多い程測定時間は短い。測定は2重測定を行う。

正確な測定の為には測定検体を正しく調整することと測定機器の適切なパラメーター設定が必要となる。

- 1 : 検体中の白血球領域の設定
- 2 : 白血球中の CD34陽性細胞領域の設定
- 3 : CD45強陽性の細胞集団を除き, CD34陽性細胞領域の設定
- 4 : CD34陽性細胞領域の設定
- 5 : 反応性の確認
- 6 : 細胞数測定の細胞領域の確認

- 7 : パラメーターによる流体の安定性のモニター
- 8 : 7-AAD による死細胞率

検体の白血球領域の設定は血算測定機器で白血球数を測定した場合とほぼ同じ測定値ができるように設定する。4ではターゲットとしているCD34陽性細胞数がカウント出来るよう設定する。8では生細胞・死細胞を区別させるヒストグラムを設定する。

### 測定結果

図1は2001年11月29日に行われた血縁ドナー同種骨髄移植でのドナー骨髄液におけるCD34陽性細胞定量の測定結果である。この検体では1 μl中193個の陽性細胞が存在し, 全CD34陽性細胞中89.4%の細胞が生細胞であることが示された。

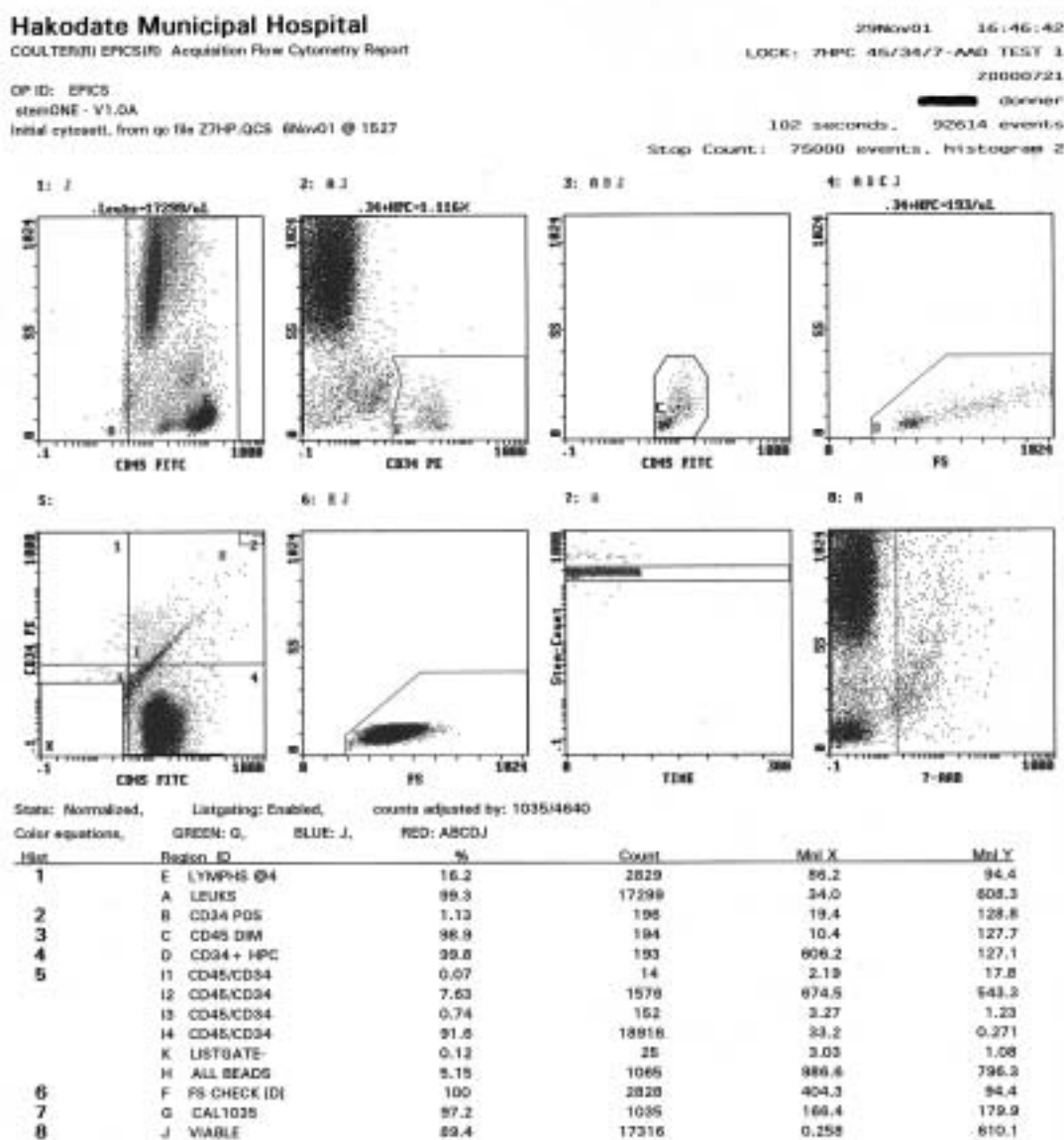


図1 FCM . CD34+細胞定量の実際

## 考 察

造血器疾患(腫瘍)の診断は形態学と細胞表面マーカー検索により行われる。形態学的診断は普通(May-Gimsa)染色や特殊染色によりおこなわれるが、腫瘍化した細胞は異なった帰属及び分化段階を示すものであっても類似の形態を示し、その鑑別は形態学上からだけでは限界がある。モノクローナル抗体を用い、細胞表面に発現した抗原の解析を行うFCMを組み合わせることで信頼性の高い診断が可能となる。腫瘍性疾患におけるFCMは腫瘍細胞に発現する種々の抗原の陽性陰性率を測定し、腫瘍細胞の性格を知るための定性分析である。

一方、造血幹細胞移植においてはドナー由来の骨髓液中・末梢血中の造血幹細胞/前駆細胞数は移植成否に直接関わる為に、骨髓移植・末梢血幹細胞移植においては欠くことの出来ない検査である。通常の形態的方法では造血幹細胞を既に分化の方向が定まった未熟細胞と区別する事は不可能である。CD34は種々の幹細胞に発現する幹細胞性抗原に対する抗体である。骨髓液や末梢血中のCD34陽性細胞は造血幹細胞であることが知られており、FCMによりCD34陽性細胞数を測定することにより造血幹細胞を正確に知ることが出来るのである。

FCMが実用化されるまでには細胞培養により形成された幹細胞コロニー数をカウントするコロニーアッセイが行われてきたが、コロニーアッセイでは培養設備と培養時間が必要であり、培養そのものに時間が必要であることから簡便さに欠ける。これに対しCD34陽性細胞測定は細胞表面の抗原を染色するだけであり、その手技は簡便である。当院ではより正確な評価を得る為にFCM・コロニーアッセイ両方の検査を実施し臨床に提供している。

造血幹細胞の測定方法はISHAGE(国際血液療法・移植学会)ガイドラインに準じている。CD34陽性細胞が真の造血幹細胞である為には以下の基準を満たすことが必要とされる。

- 1: CD34を発現していること
- 2: CD45弱陽性(芽球領域において)であること
- 3: 側方散乱が低く、前方散乱は低~中程度の芽球領域にあること

また、正しい造血幹細胞を測定する為には、以下の方法が行われる。

- 1: CD34陽性コントロール細胞を使用して測定の正確度を評価する。
- 2: サンプル(検体)を2重測定し、平均値を採用する。
- 3: 細胞ロスを防ぐ為、Non-Wash法で行う。
- 4: 生細胞・死細胞を区別し生細胞のみを測定する。

院内でのCD34陽性細胞定量の利点は次の2点が挙げられる。

表2 過去5年間の骨髓穿刺検査依頼件数

年	依頼件数	男性	女性
1997	101	69	32
1998	172	113	59
1999	135	93	41
2000	143	85	58
2001	210	125	95

表3 '99~'01における骨髓検査・診断別件数

診断(疑い名)	1999年	2000年	2001年
aplastic anemia	3	2	13
A-A以外の anemia	10	5	7
真性多血症	1	1	6
thrombocytopenia	9	11	21
pancytopenia	8	6	7
thrombocytosis	2		1
pure red cell aplasia	2	1	
顆粒球増多症	2		2
顆粒球減少症		3	2
ET		3	3
ITP	6	3	5
血球貪食症候群	1		2 <sup>*1</sup>
AML s/o	4	3	1
AML M0	5	5	
AML M1	2	20	15
AML M2	15	10	
AML M3	7	2	
AML M4	4		1
AML M4 E0			7
AML M5 a			3
AML M5 b			6
CML	7	8	5
MDS s/o	6	7	10
MDS RA		1	4
MDS RARS	2		1
MDS RAEB	2	3	2
MDS RAEB-t	3	3	9
MDS CMML	4	4	5
malignant lymphoma s/o	2	5	3
non-Hodgikin lymphoma	12	20	18
Hodgikin's disease	1		1
multiple myeloma	9	11	19
ALL		2	16
CLL	2		1
ATL	1		
myelofibrosis			5
BMT donner	1		1
Allo BMT		2	4
その他	2	2	4
計	135	143	210

\*1: マラリア感染患者で、入院後疑われた

\*2: 急性転化などによる診断変更時点で前の診断よりカウントは変更している

1: 骨髄液採取後, 検体処理を含めて約2時間程度で結果を報告可能である。

2: 凍結保存されたサンプルにおける解凍後のCD34陽性細胞数チェックが可能である。

著者らの実施結果は, ドナー骨髄液におけるCD34陽性細胞数が193個/ $\mu$ lで, 全CD34陽性細胞の89.4%が生細胞であった。これは基準値である85~115%の範囲内にあり, 測定系には問題がないものと判断された。

今後, 移植関連検査としてFCMでのCD3/CD4/CD8陽性細胞定量も行う予定である。これはドナーリンパ球輸注(DLI)細胞数評価に利用され, CD34陽性細胞定量と同様に測定ソフト・試薬キットを用いることにより実施する事が可能である。

当院では現在細胞表面マーカー・染色体分析を外注検査に頼っているが, 検査依頼から報告まで4日間を要する。過去数年の骨髄穿刺検査依頼件数・疾患別件数(表2, 3)を見ても当院での検査件数の増加・疾患の多様化が覗え, 急性期の病状ではいち早い診断・治療が必要で

あり, 迅速な検査が可能な細胞表面マーカー検査の院内化が望まれる。

#### ま と め

市立函館病院におけるFCM検査の現状を紹介した。造血幹細胞移植の実施件数が増加している現状ではFCM検査もルーチンワークとなりつつある。FCM法による検査の領域は広く, 今後マーカー検査の院内化などの検査領域の拡大が望まれる。

#### 文 献

- 1) 中原一彦: 血球検査・フローサイトメトリー, 臨病理レビュー, 2001; 115, 19-29.
- 2) 原田実根, 菌田精昭, 高上洋一: 末梢血幹細胞移植の実際, 南江堂, 2001.
- 3) 高瀬浩造: 白血病・リンパ腫解析検査 CD45ゲーティング, 株式会社SRLパンフレット.