

SE-9000およびR-3000を用いた末梢血幹細胞動員時 における造血幹細胞採取時期の指標の検索

フローチャートとスコア化の試み

岡田恭孝^{*1,3}, 安藤 学^{*1}, 新海佳子^{*1}, 萩野真子^{*1}, 伊藤 妙^{*1},
大屋春治^{*1}, 加藤武俊^{*1}, 大熊 攻^{*1}, 森島泰雄^{*2}

*1 愛知県がんセンター病院臨床検査部

*2 愛知県がんセンター病院血液化学療法部

*3 現所属：愛知県立尾張病院中央検査部
：一宮市大和町苅安賀2135（〒491-0934）

SUMMARY

末梢血幹細胞移植のための造血幹細胞を効率的に採取することを目的として、末梢血幹細胞採取のための指標をSE-9000およびR-3000を用いた日常血液検査で見出し、採取時期を予測するためのフローチャート作成および採取量を予測するためのスコア化を検討した。

非ホジキンリンパ腫で多剤併用療法Bi-CHOPにG-CSFを併用した症例を対象として、末梢血幹細胞動員時のCD34陽性細胞と血液細胞の動態を経時的に観察した。その結果を基にフローチャートを作成した。即ち、化学療法に伴うnadirの後、R-3000でHFRが4%を越え、かつ白血球数と単球数が条件を満たした時を採取時期とした。この予測採取日と実際のCD34陽性細胞数のピーク日を比較検討したところ84.0%が一致した。

また、採取液中のCD34陽性細胞数の多寡を予測するためのスコアは、CD34陽性細胞数との相関を基に、血液学的パラメーター、即ち幼若顆粒球を基準にし、単球数、血小板数、白血球数及び赤芽球数を加え配点を設定した。本スコアは、ポイント数とCD34陽性細胞数に正の相関を認めた。

Key Words

末梢血幹細胞移植 非ホジキンリンパ腫 CD34陽性細胞
血球分析装置 SE-9000 網赤血球測定装置 R-3000

はじめに

末梢血幹細胞移植（peripheral blood stem cell transplantation, 以下PBSCTと略）は、造血器腫瘍をはじめとした化学療法感受性悪性腫瘍に対する根治的治療戦略として、近年、急速に普及しつつある。この背景として、PBSCTは、骨髄移植に比し移植後の血球の回復が早期であること、また造血幹細胞採取に際し、全身麻酔を使用することなく非侵襲的に施行で

きることなどが挙げられる¹⁻³⁾。

PBSCTの成功には、量的に十分な末梢血幹細胞（peripheral blood stem cell, 以下PBSCと略）をいかに効率よく採取するかが重要な鍵となる。PBSCの採取時期の決定には、通常、フローサイトメトリー法によるCD34陽性細胞の測定が一般的に行われている⁴⁻⁶⁾。しかし、この方法では測定にフローサイトメーターと高価な抗体を必要とし、測定に2時間ほど要する。

著者らは、日常の血液検査にて迅速簡便に測定で

きる指標を見出し、効率的にPBSCを得るための検討をしてきた⁷⁾。これまでに採取時期の予測には、HFRが指標になり、また採取し得たPBSC量の予測には、幼若顆粒球数が指標となることを認め報告した⁸⁾。

著者らは、Biweekly-CHOP（以下Bi-CHOPと略）療法が施行された非ホジキンリンパ腫（以下NHLと略）症例を対象として、末梢血中のCD34陽性細胞と血液細胞の変動を経時的に観察した⁸⁾。今回、その成績を基に、PBSC採取時期決定のためのフローチャートの作成およびPBSC量を予測するためのスコア化を試みた。これにより、効率的にPBSC採取を施行することが可能となったので報告する。

対 象

対象は、1995年1月から1997年7月の間に自施設で治療した悪性リンパ腫の中から、Bi-CHOP療法が施行されたNHL17例とCHASE療法が施行されたNHL3例、ホジキン病2例の合計22例を選択した（表1）。この症例に対し、化学療法後に顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）を投与し、PBSCの動員を試みた。この時、週3回隔日に採血し、PBSCの動員に伴う血液細胞の動態を観察した。のべ治療回数は、Bi-CHOP療法が68回、CHASE療法が13回であった。

表1．対象

化学療法		Bi-CHOP	CHASE
症例数		17	5
治療回数		68	13
性別（M/F）		10/7	5/0
年齢（平均）		27～76（55）	30～53（45）
組織型	濾胞性リンパ腫	1	0
	びまん性大細胞型リンパ腫	8	1
	びまん性小細胞型リンパ腫	1	0
	マントル細胞リンパ腫	2	0
	免疫芽球型リンパ腫	2	1
	リンパ芽球型リンパ腫	1	0
	パーキットリンパ腫	1	0
	末梢性Tリンパ腫	0	1
	ホジキン病	0	2
臨床病期	期	3	0
	期	2	0
	期	3	1
	期	9	4
前治療	初回治療例	14	0
	手術前治療例	2	0
	治療抵抗性	0	1
	再発例	1	4

方 法

1. 白血球と血小板および白血球分類の測定

白血球数と血小板数の測定は、SE-9000（シスメックス）を使用した。白血球分類は引きガラス法で作製した血液塗沫標本にメイグリュンワルド・ギムザ染色を施行し、目視法で分類した。分類項目は幼若顆粒球、好中球、単球、リンパ球、赤芽球の5項目とし、各項目の百分率に白血球数を乗じた値を細胞数とした。幼若顆粒球は骨髓芽球から後骨髓球までを含め、好中球は桿状核球と分葉核球を含めた。目視法での分類は、500個カウントした値を用いた。

2. 幼若網赤血球の測定⁷⁾

幼若網赤血球の測定は、R-3000（シスメックス）を使用した。R-3000は網赤血球の数を計測する以外に、細胞内のRNAを蛍光色素のオーラミンOで染色し、レーザー光を照射することでRNA含有量に伴う蛍光強度を解析する機能を有している。R-3000は網赤血球の分布領域を蛍光強度の低い順にLFR、MFR、HFRの3分画に分類し、全網赤血球に対する比率（%）で表示する。幼若網赤血球はRNA含量が多いため蛍光強度が強くなり、HFR（high fluorescence ratio）に分類される。

3. CD34陽性細胞の測定^{7,8)}

CD34陽性細胞の測定は、比重遠心法で単核球分画を分離し、二重蛍光抗体染色を施行した。抗体は、FITC標識された単球を認識するCD14抗体（2D-15C, Silenus Laboratories）および赤血球系を認識するGlycophorin A抗体（JC159, DAKO A/S）とPE標識されたCD34抗体（HPCA-2, Becton Dickinson）を使用した。測定には、フローサイトメーターFACScan（Becton Dickinson）を使用した。

FACScanによるCD34陽性細胞数の解析は、前方散乱光（FSC:Forward Scatter）と側方散乱光（SSC:Side Scatter）で描出し、血液細胞をそれぞれの細胞集団として表示した。造血幹細胞は、FSC値およびSSC値がリンパ球と同等から単球に重なる位置に分布するという報告⁹⁾に従い、この位置をゲートで囲った。次に、ゲート内の細胞をFITCとPEの蛍光を両軸として

描出した。CD34陽性細胞率は、ゲート内への単球と赤血球混入による補正率 $\{100 / (100 - \text{FITC陽性}\%)\}$ を乗じて、リンパ球に対する比率として算出した。CD34陽性細胞数は、これに上述の白血球分類より得たリンパ球数を乗じて算出した。

なお、CD34陽性細胞と血液学的パラメーターの経時変動は、Bi-CHOP療法について行った⁸⁾。CHASE療法施行症例については、フローチャートの有用性の検討に、追加症例として用いた。また、HFRを除く上記細胞は、正規化するため対数変換した。

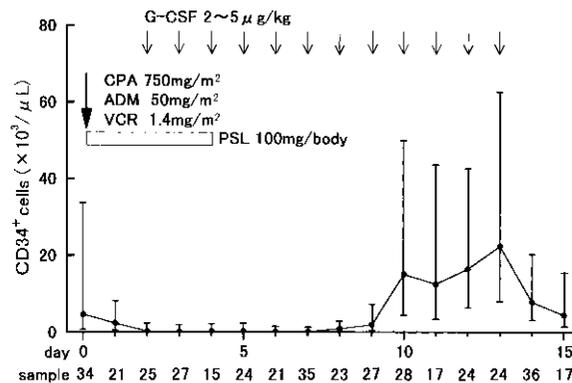


図1 . CD34陽性細胞の経時的変動

結 果

1. 末梢血CD34陽性細胞数と各血液細胞の経時的変動

CD34陽性細胞は、化学療法施行後7日前後から増え始め、12日前後(12.0±1.4日:平均±SD)でピークとなった。ピーク時の細胞数は平均 $25.0 \times 10^3 / \text{mL}$ (2.2~223.9 $\times 10^3 / \text{mL}$)であった(図1)。

CD34陽性細胞がピーク値に到達した日を基準(0日)として、白血球、好中球、単球、幼若顆粒球および血小板の各血液細胞とHFR(%)の経時的変動を比較した(図2)。白血球の動態は、CD34陽性細胞がピーク値に到達する2~5日前でnadirを示した後、急速に増加した。好中球の変動は、白血球とほぼ同様の動態を認めた。単球は、CD34陽性細胞数のピーク値到達日の4~5日前より増え始め、CD34陽性細胞のピーク値到達日まで漸増した。血小板は $10 \sim 25 \times 10^4 / \mu\text{L}$ を推移した。幼若顆粒球は、CD34陽性細胞ピーク日の2~3日前までは殆ど認めなかったが、CD34陽性細胞ピーク日に一致して増加する傾向を示した。HFRは網赤血球の動態に先行し、HFRのピーク値到達日は、CD34陽性細胞のそれに比し平均で2~3日先行した($p < 0.001$)。赤芽球は、CD34陽性細胞の増加に一致して高頻度に出現し、CD34陽性細胞のピーク値到達日には54/68検体(79%)に認められた。

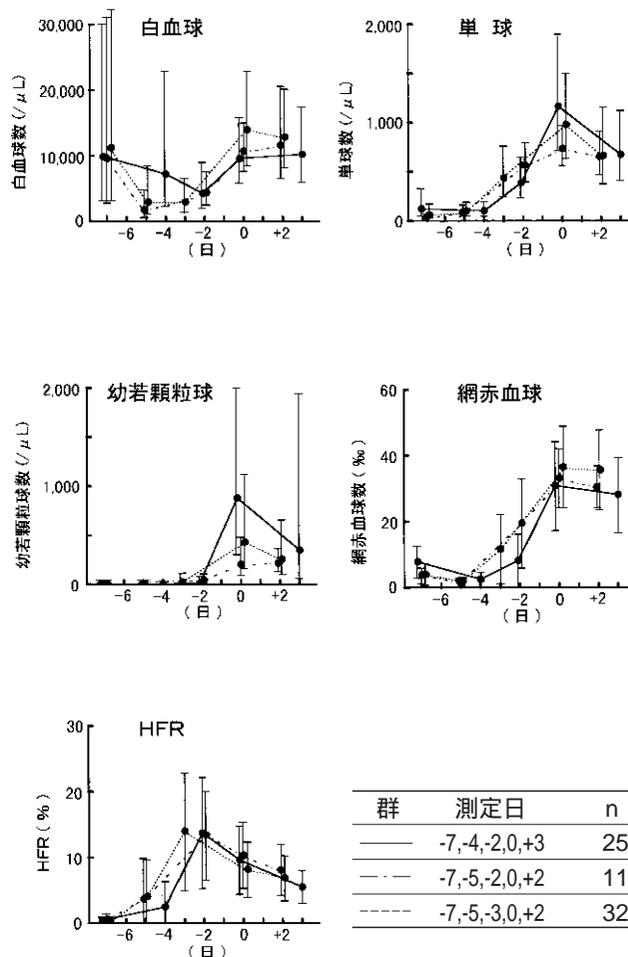
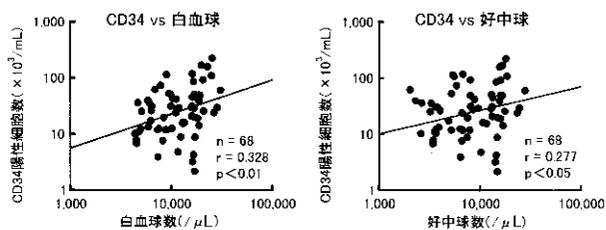


図2 . CD34陽性細胞ピーク値到達日を基準(0日)とした時の血液学的パラメーターの経時的変動

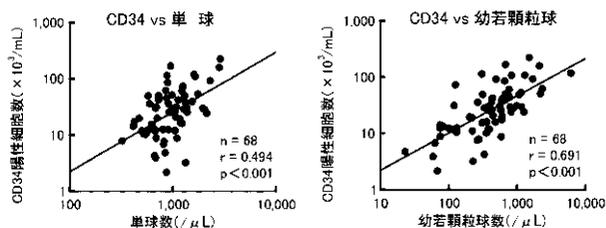
2. CD34陽性細胞数と血液学的パラメーターとの相関

CD34陽性細胞のピーク値到達日におけるCD34陽性細胞数と当日の血液学的パラメーターとの相関を図3に示す。CD34陽性細胞数と幼若顆粒球数との相関は $r=0.691$ ($p<0.001$)と検討した中で最も高い相関を示した。次いで血小板数, 単球数, 白血球数, 好中球数の順に相関を認めた。しかし, 網赤血球数およびHFRは相関を認めなかった。



3. HFRおよび単球の分布の比較

CD34陽性細胞のピーク日に対し, 4~5日前のHFRの分布と2~3日前での分布を比較した(図4左)。4~5日前のHFRの分布は0~19.6%であり, 平均値は3.5% ($3.5 \pm 5.3\%$)であった。これに対し, 2~3日前のHFRの分布は0~34.1%であり, 平均値は13.8% ($13.8 \pm 8.4\%$)で, 有意差を認めた ($p<0.01$)。



また, 単球については, CD34陽性細胞のピーク日に対し, 2~3日前の分布とピーク当日での分布を比較した(図4右)。2~3日前の単球数の平均値は $436 / \mu\text{L}$ (mean - 1SD: $259 / \mu\text{L}$, mean + 1SD: $739 / \mu\text{L}$)であった。これに対し, ピーク当日は $944 / \mu\text{L}$ (mean - 1SD: $598 / \mu\text{L}$, mean + 1SD: $1,491 / \mu\text{L}$)で, 有意差を認めた ($p<0.01$)。しかし, 両者に明確な境界値は認められなかった。

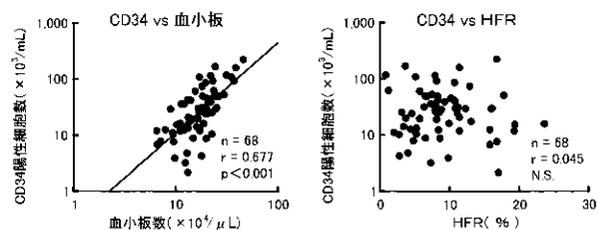


図3. CD34陽性細胞と血液学的パラメーターとの相関

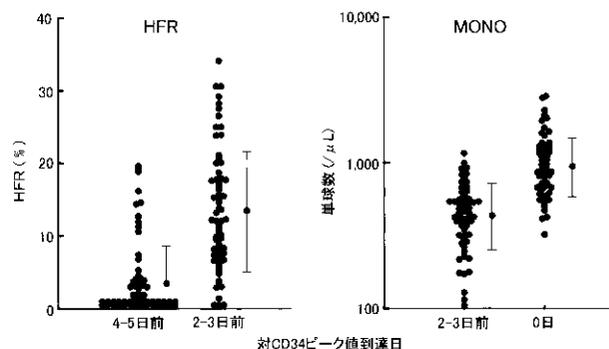


図4. HFRと単球の分布の比較

4. PBSC採取のためのフローチャート

今回の成績およびHFRの検討結果⁷⁾を基に、効率的にPBSCを採取するためのフローチャートを作成した(図5)。即ち、化学療法施行後、白血球数を経時的に測定し、nadir(8日前後)を確認する。次いでHFRを測定し、HFRが4%を超えた日を把握する。この日を基準として、後述のごとく白血球の増加と単球数を加味してフローチャートを作成した。

本方法で症例を検討したところ、Bi-CHOP療法が施行された68件中56件(82.4%)がCD34陽性細胞ピーク日に一致した。一方、12件(17.6%)が不一致で、そのうち9件はピーク日より2~3日早く、1件が2~3日後であった。残りの2件は、フローチャートで判定できず採取時期を把握できなかった。この要因として、1件はHFRが4%を超えたが単球数が基準値に達せず、他の1件はHFRのピーク値が4%を超えなかったことに起因したが、この検体の単球数は基準値を越えていた。また、CHASE療法が施行された

13件中12件(92.3%)でピーク値到達日が一致し、1件(7.7%)が一致しなかった。

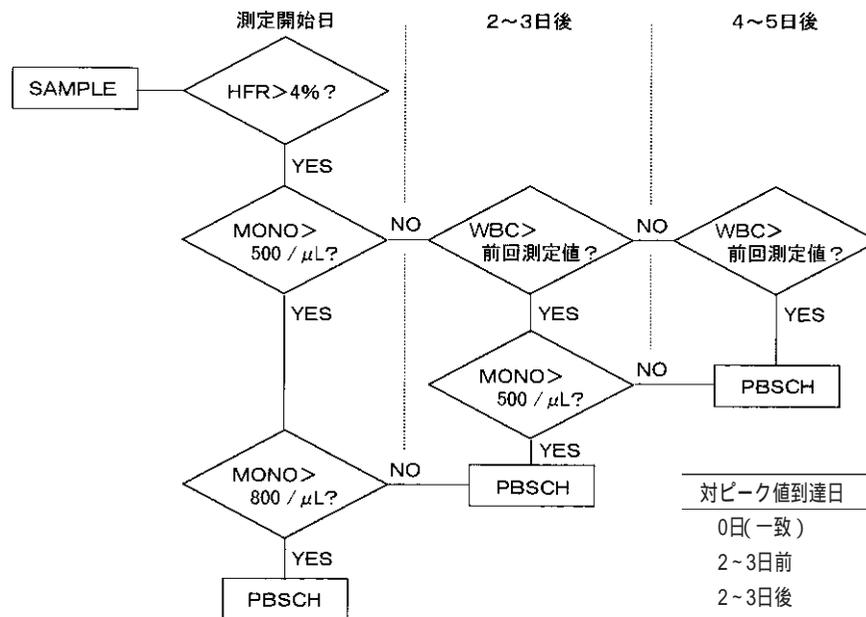
この2療法が施行された81件中68件が一致し、一致率は、84.0%であった。

5. PBSC採取量予測のためのスコア化

ピーク値到達日におけるCD34陽性細胞数を平均値で2群に分け、CD34陽性細胞と相関が認められた血液学的パラメーターについて、全体および各群の平均値を比較し(表2)、スコア化を試みた。

表2 . 血液学的パラメーターの平均値

	全体	低値群	高値群
幼若顆粒球(/ μL)	509	207	684
単球(/ μL)	988	756	1,154
血小板($\times 10^4$ / μ)	17.6	12.8	20.9
白血球($\times 10^2$ / μL)	108.6	96.3	124.3
赤芽球(%)	0.4	0.3	0.6



対ピーク値到達日	Bi-CHOP	CHASE
0日(一致)	56件(82.4%)	12件(92.3%)
2~3日前	9件(13.2%)	1件(7.7%)
2~3日後	1件(1.5%)	0件(0.0%)
適応不可	2件(2.9%)	0件(0.0%)
計	68件(100%)	13件(100%)

図5 . PBSC採取のためのフローチャートとその評価

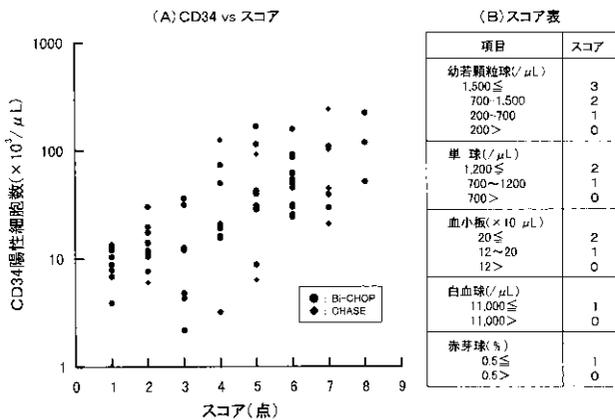


図 6 . CD34陽性細胞数とスコアとの関係

幼若顆粒球は、200 / μL、700 / μLおよび高値検体群のmean + 1SD値より1,500 / μLを基準値に設定した。CD34陽性細胞がピーク値に到達した時点で、幼若顆粒球数が1,500 / μL以上であった検体をスコア3点とし、700 / μL以上1,500 / μL未満の検体は2点、200以上700未満の検体は1点、200未満の検体は0点とした。単球と血小板は低値検体群と高値検体群のそれぞれの平均値より基準値を設定し、0 ~ 2点とした。白血球と赤芽球は全体の平均値を基準値とし、基準値以上の検体を1点、それ以下を0点とした(図6B)。

本方法で症例を検討したところ、Bi-CHOP療法が施行された症例では、CD34陽性細胞数とスコアとは正の相関を認めた。一方、CHASE療法が施行された症例では相関を認めなかった(図6A)。しかし、全症例では、スコア3点以下の群と6点以上の群には有意な差を認めた(p < 0.01)。

考 察

末梢血幹細胞移植術の成功には、量的に十分なPBSCを効率的に採取することも重要な要因の1つである。

通常、PBSC採取の指標としては、末梢血検査にて白血球数および血小板数が増加した時期^{5, 10, 11)}あるいはフローサイトメトリー法により、多能性幹細胞および前駆細胞が持つ分子マーカーとして知られているCD34陽性細胞が増加した時期に施行されている⁴⁻⁶⁾。しかし、上記の方法は、いずれも採取直前になって判

明することである。特に後者は、測定にフローサイトメーターと高価な抗体を必要とするため、あらゆる施設で可能な方法とは言い難い。

著者らは、これまでに末梢血幹細胞の採取時期をより早期に予測できる指標として、単球数とR-3000で迅速簡便に測定可能なHFRが有用であることを報告した^{7, 8)}。HFRについては、Remachaらも同様の報告をしている¹²⁾。また、PBSC採取量の予測には、幼若顆粒球数が指標になることを報告した⁸⁾。今回は、より正確なPBSCの採取時期および採取量の予測を目的に、フローチャート作成とスコア化を行った。

採取時期については、これまでの検討において、HFRが4%を越えた日から2 ~ 3日後を採取時期とする報告をした⁷⁾。しかし、HFRが4%を越えることなく推移した1件を除き、CD34陽性細胞のピーク値到達日を基準(0日)とした経時的変動で、HFRが4%を越えた時期は、最も早い検体では5日前であり、最も遅い検体ではCD34陽性細胞のピーク日当日であった。そこで今回は、HFRに単球数と白血球数を加味した。

単球数の経時的変動において、CD34陽性細胞のピーク日での単球数とその2 ~ 3日前の単球数には有意な差を認めた。しかし、両者には明らかな境界値は認められなかったため、2 ~ 3日前の平均値およびmean + 1SD値を越えた値として、それぞれ500 / μL、800 / μL以上を基準値として設定した。また白血球数はnadirから造血機能が回復したことを示すため、前回測定値に比し白血球数が増加することを条件とした。これらの条件をを組み合わせたフローチャートにより、Bi-CHOP療法が施行された68件中56件(82.4%)がピーク値到達日に一致した。またCHASE療法が施行された13件では、12件(92.3%)が一致した。全体の一致率は84.0%であり、本フローチャートは、PBSCの採取時期の予測に有用と考える。

PBSCの採取量を予測するためのスコア化は、CD34陽性細胞との相関係数を基に血液学的パラメーターに配点を設定し、全体および低値、高値検体群での平均値より基準値を設定した。CD34陽性細胞と最も相関が高かった幼若顆粒球には0 ~ 3点を配点し、単球と血小板には0 ~ 2点を配点した。白血球と赤芽球は、相関は認められたものの相関係数は低かったので

0 ~ 1点とした。

本スコアで症例を検討したところ、Bi-CHOP療法が施行された症例では、CD34陽性細胞数とスコアに正の相関を認められたが、CHASE療法が施行された症例では、相関を認めなかった。後者は、対象件数が少ないことに起因していることも考えられる。

今回の検討は、週3回の採血による検体であったため、CD34陽性細胞のピーク値またはピーク値到達日を正確に把握したとは言い難い。しかし、フローチャートおよびスコア化の成績より、日常検査で得られる血液学的パラメーターからPBSCの採取時期および採取量を予測することは可能であると考えられる。しかし、スコアが4 ~ 5点の検体は、本法で採取量を予測することは困難である。さらに症例を増し、基準値またはスコアの見直し、あるいは他のパラメーターの加味等の検討が必要と考える。

本成績は、SE-9000およびR-3000を用いた日常血液検査データを詳細に検討したことにより、日常血液検査のみでPBSCの効率的な採取が可能であることを示唆した。

文 献

- 1) Körbling M, et al.: Autologous blood stem cell (ABSCT) versus purged bone marrow transplantation(pABMT) in standard risk AML: influence of source and cell composition of the autograft on hematopoietic reconstitution and disease-free survival. *Bone Marrow Transplant* 7 : 343 ~ 349, 1991.
- 2) Henon PR, et al.: Comparison of hematopoietic and immune recovery after autologous bone marrow or blood stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant* 9 : 285 ~ 291, 1992.
- 3) 小椋美知則, 森島泰雄: 悪性リンパ腫に対する造血幹細胞移植法; 適応をどう判断するか, *内科* 80 : 487 ~ 492, 1997.
- 4) Brugger W, et al.: Mobilization of peripheral blood progenitor cells by sequential administration of interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor following polychemotherapy with etoposide, ifosfamide, and cisplatin. *Blood* 79 : 1193 ~ 1200, 1992.
- 5) 高橋 聡: CD34陽性細胞, *臨床検査* 40 : 907 ~ 913, 1996.
- 6) Engelhardt M, et al.: Blood progenitor cell (BPC) mobilization studied in multiple myeloma, solid tumor and non-Hodgkin's lymphoma patients after combination chemotherapy and G-CSF. *Bone Marrow Transplant* 19 : 529 ~ 537, 1997.
- 7) 岡田恭孝, 小池考一, 萩野真子, 他: 末梢血幹細胞採取時期決定における網赤血球強蛍光分画の有用性, *臨床検査* 40 : 1213 ~ 1218, 1996.
- 8) 岡田恭孝, 安藤 学, 加藤武俊, 他: 非Hodgkinリンパ腫患者での多剤併用療法による末梢血幹細胞動員時の血液細胞の動態, *臨床血液* 41 (2) : 91 ~ 96, 2000.
- 9) Andrews RG, et al.: Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties. *J Exp Med* 169 : 1721 ~ 1731, 1989.
- 10) 巽 典之, 山根孝久: 末梢血幹細胞の採取時期と採取方法, *医学の歩み* 176 : 574 ~ 578, 1996.
- 11) Kiss JE, et al.: Relationship of CD34 + cell dose to early and late hematopoiesis following autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 19 : 303 ~ 310, 1997.
- 12) Remacha AF, et al.: Changes in reticulocyte fractions during peripheral stem cell harvesting : role in monitoring stem cell collection. *Bone Marrow Transplant* 17 : 163 ~ 168, 1996.

Research of Timing of Stem Cell Harvest Following Peripheral Blood Stem Cell Mobilization Using the SE-9000 and R-3000

Devised of Flowchart and Score

Yasutaka OKADA^{*1,3}, Manabu ANDO^{*1}, Yoshiko SHINKAI^{*1}, Mako HAGINO^{*1},
Tae ITO^{*1}, Syunji OYA^{*1}, Taketoshi KATO^{*1}, Katashi OKUMA^{*1}, and Yasuo MORISHIMA^{*2}

^{*3} Department of Central Laboratory, Aichi Prefectural Owari Hospital,
2135 Kariyasuka, Yamato-cho, Ichinomiya 491-0934

SUMMARY

Successful transplantation of peripheral blood stem cells is dependent upon the efficiency of collection of these cells from the mobilized donor. In studies to improve our collection of hematopoietic stem cells, we discovered indicators present in the daily routine hematological examination of blood samples from these patients. Key results from the Sysmex SE-9000 and R-3000 were used to prepare a flow chart for prediction of stem cell harvest times; these results were also utilized in creating a score which can be used to predict harvest volumes.

We periodically observed the characteristics of recovery of peripheral blood cells compared with that of CD34 positive cells during the mobilization of peripheral blood stem cells.

The subjects were non-Hodgkin's lymphoma patients which had been treated with combination chemotherapy (Bi-CHOP combined with G-CSF). Based on analyzer results, a flow chart was prepared. Following chemotherapy, specific results showed that when the R-3000 reticulocyte High Fluorescence Ratio (HFR) exceeded 4%, and both leukocyte and monocyte counts met specific conditions following nadir, the harvest time was set. When comparing this predicted harvest date with the actual date of peak in CD34 positive cell counts, the agreement was 84.0%.

Additionally, baseline values and points were established in addition to hematological parameters to create scores for predicting the amount of CD34 positive cell counts in harvested peripheral blood. These scores had a positive correlation with CD34 positive cell counts.

Key Words

Peripheral blood stem cell transplantation, Non-Hodgkin's lymphoma, CD34 positive cells,
Automated hematology analyzer, SE-9000, Automated reticulocyte analyzer, R-3000