ヒト臍帯血中の CD34 陽性細胞濃縮と造血 前駆細胞の in vitro 増幅

門脇 絵実¹⁾ 高橋 恒夫¹⁾ 茂木 祐子¹⁾ 相馬 彰²⁾
萬 豊²⁾ 高後 亮²⁾ 山口 美樹³⁾ 田中 俊誠⁴⁾
藤本征一郎⁵⁾ 関口 定美¹⁾

¹⁾北海道赤十字血液センター, ²⁾札幌マタニティホスピタル

³⁾岸本医科学研究所, ⁴⁾秋田大学医学部産婦人科

⁵⁾北海道大学医学部産婦人科

(平成 6 年 3 月 9 日受付)

ENRICHMENT OF CD34 POSITIVE CELLS IN HUMAN UMBILICAL CORD BLOOD AND IN VITRO EXPANSION OF HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS

Emi Kadowaki¹⁾, Tsuneo A. Takahashi¹⁾, Yuko Mogi¹⁾, Akira Sohma²⁾, Yutaka Yorozu²⁾,
Akira Kohgo²⁾, Miki Yamaguchi³⁾, Toshinobu Tanaka⁴⁾,
Seiichiroh Fujimoto⁵⁾ and Sadayoshi Sekiguchi¹⁾

¹⁾Hokkaido Red Cross Blood Center

²⁾Sapporo Maternity Hospital

³⁾Kishimoto Clinical Laboratory, The Institute of Medical Science

⁴⁾Department of Obstetrics & Gynecology, Akita University School of Medicine

⁵⁾Department of Obstetrics & Gynecology, Hokkaido University School of Medicine

Human umbilical cord blood (HUC) contains as many hematopoietic stem/progenitor cells as bone marrow. However, this number may not be sufficient for allogenic transplantation in adults. In this study, mononuclear cells from umbilical cord blood were loaded into flasks of the AIS Micro CELLector™ to capture CD34⁺ cells. CD34⁺ cells were enriched 60 times by the treatment and the recoveries of CD34⁺ cells and colony forming cells was $37.3 \pm 19.3\%$ and $14.5 \pm 11.2\%$ ($n=14$, mean $\pm$ SD), respectively. The enriched CD34⁺ cells were then cultured in vitro for 7 to 14 days in the presence of IL-3, IL-6 and stem cell factor. The total number of cells and the number of granulocyte-macrophage colony-forming cells increased 80.8 ± 51.2 and 75.0 ± 53.6 fold, respectively in 14 days. The number of CD34⁺ cells was retained up to 7 days and increased 3-fold after 14 days. Surface marker analysis showed that the percentage of CD34⁺ CD33⁻ cells decreased from 65.5% to 4.0% in 3 days and that of CD34⁻ CD33⁺ cells increased from 3.8% to 86.2% in 7 days. The percentage of CD34⁺ CD38⁻ cells decreased from 10.6% to 3.8% in 3 days and that of CD34⁻ CD38⁺ cells increased from 10.9 to 76.2% in 7 days. These results indicate that the cultured progenitor cells differentiated as the culture period was extended.

Thus it was shown that hematopoietic progenitor cells enriched from HUC using the Micro CELLector system can be efficiently expanded in vitro.

緒 言

ヒト臍帯血には骨髓と同程度の造血幹細胞が含まれていることが知られている¹⁾²⁾。欧米ではこの臍帯血を小児を対象に造血幹細胞移植に利用する試みが進められてきており^{3)~8)}、最近では臍帯血バンクの構想も具体化されつつある⁹⁾。しかし臍帯血の採取量は胎盤全体から得た場合でも100~150ml程度¹⁾と限りがある。移植に必要な顆粒球マクロファージコロニー形成細胞 (CFU-GM: colony-forming unit granulocyte/macrophage) の数は骨髓、末梢血によって異なるが、体重1kgあたり 1×10^5 以上¹⁰⁾とされており、臍帯血の場合には体重1kgあたり 10^4 オーダーの CFU-GM の移植で成功した例も報告されている⁴⁾⁶⁾⁷⁾。しかし成人の移植に十分量の造血幹細胞を臍帯血から得ることは現在のところ難しいと考えられる¹¹⁾。従って臍帯血中の造血幹細胞を *in vitro* で増幅させ十分量の幹細胞を得ることができれば非常に大きな幹細胞供給源の拡大となる。In vitro 増幅を効率的に行うにはまず造血幹細胞の増幅を抑制する可能性のあるサイトカインを放出するリンパ球・単球¹²⁾を可能な限り除去することが必要であると考えられる。そこで今回我々は抗 CD34 抗体を底面に吸着させたフラスコを用いたパニング法によりヒト臍帯血中の CD34 陽性細胞を濃縮し、*in vitro* における造血幹細胞・前駆細胞の増幅を種々のサイトカイン存在下で検討し、14日間の培養で CFU-GM を約75倍に増幅することが出来たので報告する。

材料と方法

1. 臍帯血採取

臍帯血は、抗凝固剤 CPD (citrate phosphate dextrose) を含むシリンジを用い、同意を得た妊婦の分娩後 (在胎週齢37~42週) に臍帯静脈より採取した。

2. 単核球の分離

採取した臍帯血3~5ml を4ml の Ficoll-Paque (比重1.0777, Pharmacia, Piscataway, NJ, USA) に重層し、380×g で30分、室温で遠心し単核球層を回収した。この単核細胞をイスコフ改変ダルベッコ培地 (Iscove's Modified Dulbecco's

Medium, IMDM: 免疫生物研究所, 群馬) で2回洗浄した後、非特異吸着を防ぐため0.5% ヒト γ -グロブリンを添加した1mM EDTA/2Na 加 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 不含ダルベッコリン酸緩衝液 (Dulbecco phosphate buffered saline with EDTA/ Ca^{2+} Mg^{2+} free: D-PBSE/CMF) に浮遊した。

3. CD34陽性細胞の濃縮

分離した単核球の浮遊液を、D-PBSE/CMF でプライミングした Micro CELLector (Applied Immune Sciences, Menlo Park, USA), soybean agglutinin (SBA) 結合フラスコ中に入れて、室温で1時間静置した。細胞数は1フラスコあたり 2×10^7 個以下とした。SBA フラスコ処理により、一部の T リンパ球、B リンパ球が除去される¹³⁾¹⁴⁾。

フラスコ上清の非付着細胞 (SBA⁻細胞) を回収し、次に D-PBSE/CMF でプライミングした抗 CD34 抗体結合フラスコに加えてさらに1時間、室温で静置した。上清を除去し D-PBSE/CMF で細胞吸着面を洗浄後、10% 牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS: 免疫生物研究所, 群馬) 含有 D-PBSE/CMF を加えてフラスコ側面を数回手で叩いて付着細胞 (CD34⁺細胞) を遊離させピペットにて回収した。次いで同じ操作を2回繰り返し CD34⁺細胞を回収した。

4. 液体培養

最終濃度200 U/ml インターロイキン-3 (Interleukin-3, IL-3: キリン, 群馬), 100 ng/ml インターロイキン-6 (Interleukin-6, IL-6: キリン), 100 ng/ml stem cell factor (SCF: キリン) を20% (v/v) FCS 含有 IMDM に添加し、濃縮前の単核球と濃縮後の CD34 陽性細胞を37°C 5% CO₂ インキュベーター内で液体培養した。培養7日目と14日目の細胞について、細胞数の測定およびコロニーアッセイを行った。

5. コロニーアッセイ

3% (v/v) FCS, 1% (v/v) 牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA: Sigma, St. Louis, MO, USA), 50 μ M 2-メルカプトエタノール (2-mercaptoethanol: 半井化学薬品, 京都), 10 ng/ml IL-3, 10 ng/ml 顆粒球コロニー刺激因子

(granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF: 中外製薬, 東京), 2units/ml エリスロポエチン(erythropoietin, Epo: 中外製薬), 0.8%(w/v) メチルセルロース (室町化学工業, 東京) を含む IMDM に, 単核球は最終濃度 2×10^4 個/ml, CD34陽性細胞は 1×10^3 個/ml となるように加えた。これらをよく混和した後, 35×10 mm プラスチックディッシュ 1 枚あたり 1ml を分注し, 37°C の CO_2 インキュベーター内で 14 日間培養した。CFU-GM, 赤芽球コロニー形成細胞 (bursts forming units erythroid: BFU-E), 混合コロニー形成細胞 (mixed colony forming units: CFU-mix) から形成されたコロニーを倒立顕微鏡下で計数した。

6. フローサイトメトリー分析

CD34, CD33, CD38陽性率は, 分離した単核球に蛍光標識抗 CD34(HPCA2), 抗 CD38(Leu17: 以上 Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain View, CA, USA), 抗 CD33 (My9: Coulter Immunology, Hialeah, FL, USA) を添加して 4°C で 30 分間反応させた後洗浄し, フローサイトメーター (ORTHO CYTORON: オーソ社) を用いて測定した。

結 果

1. CD34陽性細胞の精製率および回収率

Micro CELLector 処理前後の細胞数および CD34陽性率を表 1 に示した。処理に有した時間は SBA 陰性細胞分離に約 1 時間 30 分, CD34⁺細胞分離に約 1 時間 30 分, 計約 3 時間要した。SBA フラスコ処理後, 細胞数は処理前の約 3 分の 1 となり, CD34結合フラスコ処理後, 細胞数は 100 分の 1 以下となった。CD34陽性率は処理前は $0.9 \pm 0.4\%$ (平均 $\pm$ SD, $n=14$) であったが, 処理後 $58.9 \pm$

表 1 Micro CELLector による臍帯血 CD 34 陽性細胞分離

	処理前	処理後
細胞数 ($\times 10^5$)	412 ± 145	2.4 ± 1.2
CD 34 陽性率 (%)	0.9 ± 0.4	58.9 ± 17.4
回収率 (%)	100	37.3 ± 19.3

平均 $\pm$ SD $n=14$

17.4% まで精製された。CD34⁺細胞の回収率は $37.3 \pm 19.3\%$ であった。Micro CELLector は CD34 (+) 抗原を強く発している細胞を選択して採取している可能性もあり得るが, 今回の我々の結果では処理前後の CD34 (+) 抗原の発現の強さに変化は見られなかった。また, Micro CELLector で処理した細胞, CD34⁺細胞中のサブセットを CD33⁺, CD33⁻, CD38⁺, CD38⁻の表面マーカーで調べたが, Micro CELLector 処理によってサブセット特異的な細胞の回収率の違いはみられなかった (データ示さず)。

コロニー形成率と濃縮倍率, コロニー形成細胞の濃度と回収率を表 2 に示した。CFU-GM, BFU-E, CFU-mix のコロニー形成率の濃縮倍率はそれぞれ 26.2 ± 19.1 ($n=14$), 24.1 ± 16.2 , 20.2 ± 28.5 倍であった。表 2 における濃縮倍率は個々の処理前後のコロニー形成率より算出した。またコロニー形成細胞の回収率は CFU-GM, BFU-E, CFU-mix でそれぞれ 14.8 ± 12.5 , 14.3 ± 10.7 , $11.4 \pm 16.5\%$ であり, これらを合わせたトータルのコロニー形成細胞の回収率は $14.5 \pm 11.2\%$ であった。このコロニー形成細胞の回収率はいずれも CD34陽性細胞の回収率 (表 1) に比べて低い値を示した。

2. 液体培養による造血前駆細胞の増幅

Micro CELLector 処理および未処理の細胞を SCF, IL-3, IL-6 存在下で液体培養したときの細胞数の変化を調べた (図 1)。未処理の細胞では培養

表 2 Micro CELLector 処理前後のコロニー形成率およびコロニー数
コロニー形成率 (%)

	CFU-GM	BFU-E	CFU-mix	Total
処理前	0.4 ± 0.3	0.2 ± 0.1	0.02 ± 0.02	0.6 ± 0.4
処理後	6.6 ± 2.6	4.7 ± 2.1	0.3 ± 0.3	11.7 ± 3.8
純化度 (倍)	26.2 ± 19.1	24.1 ± 16.2	20.2 ± 28.5	25.6 ± 18.0

コロニー数

	CFU-GM ($\times 10^3/\text{ml}$)	BFU-E ($\times 10^3/\text{ml}$)	CFU-mix ($\times 10^2/\text{ml}$)	Total ($\times 10^4/\text{ml}$)
処理前	9.4 ± 6.1	5.9 ± 3.2	4.6 ± 6.1	1.6 ± 0.9
処理後	1.2 ± 0.9	0.7 ± 0.5	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1
回収率 (%)	14.8 ± 12.5	14.3 ± 10.7	11.4 ± 16.5	14.5 ± 11.2

平均 $\pm$ SD $n=14$

7日目で平均2.4倍、14日目で6.5倍に増幅したのに対し、Micro CELlector 処理により濃縮した細胞は7日目で28.4倍、14日目では80.8倍と増幅が認められた。

同様にコロニー形成細胞の増幅をみたが、CFU-GM の数は未処理では14日間で培養前の45.0倍、濃縮した場合では75.0倍まで増幅した (図2)。SCF, IL-3, IL-6存在下での培養後のコロニーはいずれも CFU-GM が大部分を占めており、BFU-E, CFU-mix は14日間の培養においても、培養前に

図1 液体培養における細胞の増幅。臍帯血単核球および Micro CELlector で処理後細胞を IL-3, IL-6, SCF 存在下で液体培養した時の細胞数の変化。培養前の細胞数を1.0とする。

図2 液体培養における CFU-GM の変化。臍帯血単核球および Micro CELlector で処理後細胞を IL-3, IL-6, SCF 存在下で液体培養した時の CFU-GM 数の変化。培養前の GM clones の数を1.0とする。

比べてほとんどその増幅が見られなかった (データ示さず)。

3. 液体培養における表面マーカーの変化

Micro CELlector 処理して濃縮した細胞を液体培養したときの表面マーカーの変化を調べた (図3)。CD34⁺CD33⁻細胞の割合は経時的に減少し、培養3日目に培養開始時の65.5%から4.0%になった。また培養7日目には CD34⁺CD33⁻細胞は減少し86.2%の細胞は CD34⁺CD33⁺細胞であった。CD34⁺CD38⁻においても CD34⁺CD33⁻細胞の場合と同様に経時的に減少し、培養3日目には10.6%から3.8%に減少し、培養7日目には76.2%の細胞が CD34⁺CD38⁺であった。

考 察

臍帯血・胎盤血には高濃度の造血幹細胞、前駆細胞が含まれることから、骨髓移植にかり得る造血幹細胞の供給源として期待されている^{3)~9)}。臍帯血中のコロニー形成細胞は mixed colonies を多く形成し、前駆細胞のなかでもより未分化の細胞が高い割合で含まれていると考えられる¹⁵⁾。また臍帯血に含まれる幹細胞数は在胎週数と関連し胎生初期ほど造血が盛んであり¹⁶⁾、骨髓中のものより質・量ともに移植に適しているという報告もある^{17)~19)}。しかし実際の移植を考えると採血可能な臍帯血は胎盤血を含めても量に限りがあるため、成人に移植するためには造血幹細胞・前駆細胞の効率的な増幅法の開発が必要である。

造血幹細胞が CD34抗原を発現していることは良く知られており^{20)~22)}、今回我々が使用した Micro CELlector も含めて抗 CD34抗体を用いた幹細胞濃縮のためのシステムが開発されている^{23)~25)}。しかしこれらのシステムは標的細胞の回収率の低値などまだ検討すべき点がある。今回の検討では CD34陽性細胞回収率は約37%であり (表1)、室井ら²⁶⁾の報告した回収率27%に比較すると高値であった。しかし Cardos ら²⁷⁾は、臍帯血には付着性細胞が多く含まれているため単核球をそのまま Micro CELlector で処理すると回収率が悪くなるとし、プラスチックシャーレにて単核球中付着細胞を除去してから Micro CELlector で処理すると約48%の回収率が得られると報告し

図3 液体培養における表面マーカーの分析。Micro CELLector 処理後細胞を IL-3, IL-6, SCF 存在下で液体培養した時の CD34, CD33, CD38 抗原の変化。
A: Micro CELLector 処理後細胞の CD34, CD33 抗原発現の変化。B: Micro CELLector 処理後細胞の CD34, CD38 抗原発現の変化。

ている。また CD34陽性細胞回収率と比べるとコロニー形成細胞回収率が低値であり、検体によっては10%を下回っているものもあった(表2)。一つの可能性として臍帯血を採取してから単核球を分離するまでの時間などがコロニー形成細胞回収率の高低に影響しているのではないかと考えられる。また今回は Ficoll-Paque を用いて単核球の分離を行ったが、コロニー形成細胞のうち高比重の細胞は回収されないという可能性も考えられる。これらの点も CD34陽性細胞の回収率を上げるとともに今後検討すべきところである。

In vitro 増幅においては CD34陽性細胞を濃縮した細胞は IL-3, IL-6, SCF の存在下で14日間液体培養により CFU-GM は75.0倍に増幅し(図2), 未処理の細胞培養に比べてその増幅率は大きかった。Lebkowski ら²⁷⁾は骨髓から Micro CELLector で CD34陽性細胞を濃縮し IL-1, IL-3, IL-6, GM-CSF, G-CSF, Epo, SCF 存在下で液体培養し CFU-GM は約20倍に増幅したと報告している。今回の結果からみると臍帯血では骨髓の3倍以上の増幅が可能であることになる。実際の移植を考えた場合には無血清培養での増幅が期待されるが、ヒト臍帯血、骨髓中の CD34陽性細胞を無血清培養条件下、IL-11, IL-6, SCF の組み合わせで14日間前後で数十倍にコロニー形成細胞が増幅したという報告がある²⁸⁾。

液体培養における表面マーカーの解析より培養期間が長くなるにつれ細胞は分化していることが示された(図3)。CD34陽性細胞の占める割合は培養期間が長くなると減少したが、全体の細胞数は培養とともに増加しているため、CD34陽性細胞総数は培養7日目まで保持され、14日目には約3倍に増大した。Lebkowski ら²⁷⁾は培養7日目までは CD34陽性細胞数は保持されたがその後急激に低下したと我々とは少し異なる結果を報告している。

以上のことから Micro CELLector による CD34陽性細胞濃縮は in vitro における造血幹細胞・前駆細胞の増幅に有効であり、濃縮した細胞を in vitro で培養することにより、より多くの造血前駆細胞を得ることが可能であった。In vitro

増幅させた細胞の移植により骨髓造血能を再構築させるためには、自己複製能をもつ細胞(多能性幹細胞)をいかにして維持し、かつ分化を抑制して増幅させるかがもっとも重要な問題となる²⁸⁾²⁹⁾。今回の培養条件下では未分化な前駆細胞はより分化する方向へとすすんでいることが示唆されたが、採取した臍帯血の一部を増幅培養し、残りを増幅せずにそのまま移植すれば、造血の再構築の可能性が期待できる。

まとめ

臍帯血を Micro CELLector でパンニング処理することにより、CD34陽性細胞を約60倍に濃縮することが可能であり、その回収率は約37%であった。パンニング後のコロニー形成細胞の回収率は約14%で、CD34陽性細胞に比べ低い値であった。濃縮した CD34陽性細胞を、SCF, IL-3, IL-6存在下で14日間液体培養すると CFU-GM は約75倍に増幅した。CD34陽性細胞数は7日間保持され14日間で3倍に増幅した。しかし14日間の培養期間中に大部分の CD34陽性細胞は分化が進んでいることが示された。

文 献

- 1) Broxmeyer, H.E., Douglas, G.W., Hangoc, G., Cooper, S., Bard, J., English, D., Arny, M., Thomas, L. and Boyse, E.A.: Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86: 3828-3832, 1989.
- 2) Rubinstein, P., Rosenfield, R.E., Adamson, J.W. and Stevens, C.E.: Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood*, 81: 1679-1690, 1993.
- 3) Gluckman, E., Broxmeyer, H.E., Auerbach, A. D., Friedman, H.S., Douglas, G.W., Devergie, A., Esperou, H., Thierry, D., Socie, G., Lehn, P., Cooper, S., English, D., Kurtzberg, J., Bard, J. and Boyse, E.A.: Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N. Eng. J. Med.*, 321: 1174-1178, 1989.
- 4) Gluckman, E., Devergie, A., Thierry, D., Esperou-Bourdeau, H., Traineau, R., Gerrota, J., Brossard, Y., van Niftrik, J. and Benbunan, M.: Clinical applications of stem cell transfu-

- sion from cord blood and rationale for cord blood banking. *Bone Marrow Transplant.*, 9(Suppl. 1): 114—117, 1992.
- 5) Broxmeyer, H.E., Kurtzberg, J., Gluckman, E., Auerbach, A.D., Douglas, G., Cooper, S., Falkenburg, J.H.F., Bard, J. and Boyse, E.A.: Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation. *Blood Cells*, 17: 313—329, 1991.
 - 6) Vilmer, E., Sterkers, G., Rahimy, C., Denamur, E., Elion, J., Broyart, A., Lescœur, B., Tiercy, J.M., Gerota, J. and Blot, P.: HLA-mismatched cord-blood transplantation in a patient with advanced leukemia. *Transplant.*, 53: 1155—1157, 1992.
 - 7) Wagner, J.E., Broxmeyer, H.E., Byrd, R.L., Zehnbauser, B., Schmeckpeper, B., Shah, N., Griffin, C., Emanuel, P.D., Zuckerman, K.S., Cooper, S., Carow, C., Bias, W. and Santos, G. W.: Transplantation of umbilical cord blood after myeloablative therapy: Analysis of engraftment. *Blood*, 79: 1874—1881, 1992.
 - 8) Bogdanic, V., Nemet, D., Kastelan, A., Latin, V., Petroveckí, M., Brkljacic-Surlakovic, L., Kerhin-Brkljacic, V., Aurer, I., Konja, J., Mrcic, M., Kalenic, S. and Labar, B.: Umbilical cord blood transplantation in a patient with Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia. *Transplant.*, 56: 447—479, 1993.
 - 9) Gluckman, E., Wagner, J., Hows, J., Kernan, N., Bradley, B. and Broxmeyer, H.E.: Cord blood banking for hematopoietic stem cell transplantation: an international cord blood transplant registry. *Bone Marrow Transplant.*, 11: 199—200, 1993.
 - 10) Juttner, C.A., To, L.B., Haylock, D.N., Dyson, P.G., Thorp, D., Dart, G.W., Ho, J.Q.K., Horvath, N. and Bardy, P.: Autologous blood stem cell transplantation. *Transplant. Proceed.*, 21: 2929—2931, 1989.
 - 11) 茂木祐子, 門脇絵実, 高橋恒夫, 田中俊誠, 相馬彰, 萬 豊, 高後 亮, 山口美樹, 藤本征一郎, 関口定美: ヒト臍帯血中に含まれる造血幹細胞の分析. *日本輸血学会雑誌*, 第41回輸血学会総会号・抄録, 39: 471, 1993.
 - 12) 堀田知光: 抗癌剤から造血幹細胞を保護する SCI/MIP-1 α (stem cell inhibitor/macrophage inflammatory protein-1 α). *血液・腫瘍科*, 24: 240—243, 1992.
 - 13) Reisner, Y., Kapoor, N., Hodes, M.Z., O'Reilly, R.J. and Good, A.: Enrichment for CFU-C from murine and human bone marrow using soybean agglutinin. *Blood*, 59: 360—363, 1982.
 - 14) Ebell, W., Castro-Malasina, H., Moore, M.A.S. and O'Reilly, R.J.: Depletion of stromal cell elements in human marrow grafts separated by soybean agglutinin. *Blood*, 65: 1105—1111, 1985.
 - 15) 高橋恒夫, 関口定美, ヒト臍帯血中幹細胞移植の問題点. *医学のあゆみ*, 167: 689—691, 1993.
 - 16) 西平浩一, 豊田恭徳, 本多康次郎: 臍帯血造血幹細胞の検討—在胎週数別の幹細胞数と採取可能幹細胞数—. 第16回, 日本骨髓移植研究会抄録: 10, 1993.
 - 17) Hows, J.M., Bradley, B.A., Marsh, J.C.W., Luft, T., Coutinho, L., Testa, N.G. and Dexter, T.M.: Growth of human umbilical-cord blood in long-term hematopoietic cultures. *Lancet*, 340: 73—76, 1992.
 - 18) Lu, L., Xiao, M., Shen, R.N., Gigsby, S. and Broxmeyer, H.E.: Enrichment characterization and responsiveness of single primitive CD34⁺⁺ human umbilical cord blood hematopoietic progenitor with high proliferative and replating potential. *Blood*, 81: 41—48, 1993.
 - 19) Bender, J.G., Unverzagt, K.L., Walker, D.E., Lee, W., Epps, D.E.V., Smith, D.H., Stewart, C. C. and To, L.B.: Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulation from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry. *Blood*, 77: 2591—2596, 1991.
 - 20) Leon, W.M.M., Haug, S.T., Safford, D., Lansdorp, P.M. and Loken, M.R.: Sequential generation of hematopoietic colonies, derived from single nonlineage committed CD34⁺ CD38⁻ progenitor cells. *Blood*, 77: 1218—1227, 1991.
 - 21) Civin, C.I., Strauss, L.C., Brovall, C., Fackler, M.J., Schwartz, J.F. and Shaper, J.H.: A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J. Immunol.*, 133: 157—165, 1984.
 - 22) Lu, L., Walker, D., Broxmeyer, H.E., Hoffman, R., Hu, W. and Walker, E.: Characterization of adult human marrow hematopoietic progenitor highly enriched by two-color cell sorting with My10 and major histocompatibility class II monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, 139: 1823—1829, 1987.
 - 23) Cardoso, A.A., Li, M.L., Batard, P., Sansilvestri, P., Hatzfeld, A., Levesque, J.P., Lebkows-

- ki, J.S. and Hatzfeld, J.: Human umbilical cord blood CD34⁺ cells purification with high yield of early progenitors. *J. Hematotherapy*, 2: 275—279, 1993.
- 24) Smeland, E.B., Funderud, S., Kvalheim, G., Gaudernack, G., Rasmussen, A.M., Rusten, L., Wang, M.Y., Tindle, R.W., Blomhoff, H.K. and Egeland, T.: Isolation and characterization of human hematopoietic progenitor cells: An effective method for positive selection of CD34⁺ cells. *Leukemia*, 6: 845—852, 1992.
- 25) Berenson, R.J., Bensinger, W.I., Kalamsz, D. and Matin, P.: Elimination of Daudi lymphoblasts from human bone marrow using avidin-biotin immunoadsorption. *Blood*, 67: 509—515, 1986.
- 26) 室井一男: 幹細胞濃縮の利点と問題点. *血液・腫瘍科*, 25: 321—324, 1992.
- 27) Lebkowski, J., Schain, L., Harvey, M., Moseley, A. and Okarma, T.B.: Direct isolation and expansion of human CD34⁺ hematopoietic stem cells. *J. Hematotherapy*, 2: 339—342, 1993.
- 28) 池淵研二: 末梢血幹細胞の液体培養による移植の可能性. *医学のあゆみ*, 167: 685—688, 1993.
- 29) Sato, N., Sawada, K., Koizumi, K., Tarumi, T., Ieko, M., Yasukouchi, T., Yamaguchi, M., Takahashi, T.A., Sekiguchi, S. and Koike, T.: In vitro expansion of human peripheral blood CD34⁺ cells. *Blood*, 82: 3600—3609, 1993.
-