

カウント数を上げるためにプロトコルを改良した。しかし、単にサンプル量を増やし、測定時間を増やしただけでは再現性を改善することはできない。なぜなら、標準粒子コントロールビーズの細胞への吸着、沈降、細胞の凝集が起こるからだ。そこで従来プロトコルを改良し、短い測定時間でより多くのカウント数を得ようとした。結果として、CD34 陽性細胞のカウント数は平均  $174 \pm 18$  (range: 88-404) に増加し、白血球におけるパーセント値は標準プロトコルの測定結果に近い  $0.019 \pm 0.002$  (range: 0.014%-0.038%) であった。取り除いた上澄みを解析したところ、細胞も標準粒子コントロールビーズも見当たらなかった。

#### 累積変動係数の向上

文献等によると、動員末梢血で測定した変動係数は、ProCount では 8%、Stem-Kit では 4% である。しかし、脳血管障害患者の非動員末梢血では、動員末梢血と比較してみると、CD34 陽性細胞は 10% 程度であった。累積変動係数で見れば、ProCount で 30.3%、Stem-Kit で 25.7% であった。我々の測定法では同じ測定時間で 5 倍にも細胞カウント数を増加させることができ、累積変動係数も 7.4% であった(表 1)。

#### D. 考察

CD34 陽性細胞数は各方法とも近い値を示しているが、実際十分な再現性が得られたのは改良した方法であった。そして新しい方法は、我々が以前用いた手法よりも再現性のあるものとして、取り入れた。

CD34 陽性細胞の CV 値は、得られた CD34 陽性細胞数の平方根に比例して変動する。CV 値を 10% 得るには最終的な CD34 陽性細胞のカウント数が 100 は必要で

ある。改良プロトコールでは、100 以上のカウント数を得て、CV 値も 7%となった。単にサンプル量を増やし、測定時間を長くしただけでは再現性を改善することはできない。末梢血中に CD34 陽性細胞が少ない患者の CD34 陽性細胞の絶対数を、この ISHAGE プロトコールを改良したもので、ただちに正確に測定し得ることを、この結果で示すことができた。この簡便な方法は、末梢血において幹細胞分画である CD34 陽性細胞の正確な測定方法となり、心臓脳血管障害患者のみならず他のあらゆる疾患、あらゆる状態の患者検体をスクリーニングすることが可能である。

#### E. 結果

患者末梢血中の CD34 細胞数を信頼性高く定量する方法を開発した。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

現在投稿中

厚生労働科学研究費補助金

痴呆・骨折臨床研究事業

分担研究報告書

分担研究課題

「痴呆患者における患者病態と末梢血 CD34 陽性細胞定量法の関連」  
に関する研究

分担研究者

松山 知弘	兵庫医科大学	神経内科	講師
長束 一行	国立循環器病センター	内科脳血管部門	医長
福永 隆三	星ヶ丘厚生年金病院	脳卒中内科	副院長

研究要旨

血管系幹細胞を用いた心血管再生療法はすでに臨床応用がなされている。これを虚血性脳血管障害による血管性痴呆やアルツハイマー型老年痴呆に応用できれば高齢者の福音となる。脳血管再生療法が脳機能を改善し、痴呆の治療法となりうるかどうかを評価する目的で、脳血管性痴呆患者やアルツハイマー型痴呆患者など痴呆患者を対象に血管再生に関わる末梢血中血管系幹細胞（CD34 陽性細胞）数を測定し、1）臨床診断の根拠として活用できるか、2）早期診断に有用であるか、3）虚血性脳血管障害や痴呆の予後の予測が可能であるか、について検討した。今年度は平成 17 年 3 月 15 日現在、痴呆を有する患者約 80 名のエントリーが終了しており、引き続き患者登録を行っている。本研究では、末梢血中幹細胞（CD34 陽性細胞）を量的、質的に評価し、12 ヶ月後にも再評価することで、機能予後や痴呆の進行に関しても検討する予定である。

## A. 研究目的

近年の高齢社会において脳血管障害後遺症による痴呆など要介護患者の急激な増加は重大な社会問題となっている。最近注目されている血管新生療法は、循環器領域における虚血臓器障害の治療の新戦略として注目されているが、神経領域における応用を支持しうる十分な臨床データがないのが現状である。本研究では血管再生に関わる血管系幹細胞が虚血性脳血管障害患者の予後決定に関与するか、アルツハイマー型痴呆や脳血管性痴呆における痴呆進展と相関があるかどうかを検討した。痴呆症例の解析においてはアルツハイマー型痴呆などの神経変性型痴呆症例と脳血管性痴呆症例の末梢血中血管系幹細胞の対比検討を予定している。それによりアルツハイマー型痴呆症における血管因子の関与が明らかになると共に、脳血管性痴呆症とアルツハイマー型痴呆症の鑑別診断において末梢血中血管系幹細胞の定量的評価は有用な検査法として発展が可能であると考えている。

## B. 研究方法

### 1) 研究計画書の作成および審査

兵庫医科大学、国立循環器病センターおよび星ヶ丘厚生年金病院倫理委員会において承認を受け、十分なインフォームドコンセントに基づいた本人（本人にその能力のない時は、その代理人）の意志で同意書を得た後に検査を施行した。また、施設外に出すサンプルは採取後に完全に匿名化を行い、個人識別情報は厳重に管理し、プライバシーの保護に努めている。

### 2) 対象患者群および病態評価

アルツハイマー型痴呆患者、痴呆症状を伴うパーキンソン病患者および脳血管性痴呆症患者を対象とし、NIHSS、modified Rankin scale、Barthel Index、

Mini Mental State Examination (MMSE)、長谷川式痴呆スケール(HDS)、Global Clinical Dementia Rating (CDR)を行い、末梢血中 CD34 陽性細胞測定用の採血を行った。

### 3) 血管血球系幹細胞解析方法

解析方法によるばらつきを抑えるため、匿名化後、全ての病院のサンプルを国立病院機構大阪南医療センターに集積し、我々が開発した非常に精度の高い測定方法にて解析した（解析の詳細に関しては、相馬らによる分担研究報告書を参照）。

また、採取血液中の CD34 陽性細胞の免疫組織化学的検討を行い、末梢血中 CD34 陽性細胞の形態を観察することにより、脳血管障害患者や痴呆患者の末梢血血管系幹細胞の質的評価を試みる。

### 4) 脳障害患者の病態評価

MMSE、CDR、DSM-III-R、HDS-R により痴呆の判定を行い、各種画像検査と共に病態の評価を行うとともに、エントリー後の経時的変化に関する追跡調査を行っている。

## C. 研究結果

本研究は末梢血中血管血球系幹細胞と患者予後との関連の解明を目的とした、前向き経時的コホート研究であり、各種痴呆症患者を対象にした臨床研究プロトコールを作成し、各施設の倫理委員会において承認後、患者エントリーを開始している。平成 17 年 3 月の時点で約 80 名の痴呆患者の病態評価と末梢血中幹細胞の測定を終えており、引き続き患者登録を行っている。

本研究では、患者末梢血中幹細胞（CD34 陽性細胞）を量的、質的に評価し、12 ヶ月後にも再評価することで、機能予後や痴呆の進行に関しても検討する予

定である。予備研究において末梢 CD34 陽性細胞は単一の丸い核を有するほぼ円形の細胞であり、形態的に mononuclear cell であることが確認された。細胞の形態学的変化が病態によって変化するかどうかを評価できれば血管系幹細胞機能を評価できる新たな有用な検査法として発展が可能であると考えている。

#### D. 考察

我々はすでに末梢血中の CD34 陽性細胞や CD133 陽性細胞などの血管血球系幹細胞の減少が脳梗塞の発症と強く関連していること、そしてこれらの血管血球系幹細胞の減少が単に血流低下に関与しているだけではなく、血管新生に関わる血管内皮細胞の機能の低下とも関連していることを示している。このことは、脳血管を構成する血管内皮細胞の平均寿命は約 3 年であることを考えると、末梢血中の血管血球系幹細胞が脳血管のメンテナンスに関与しているだけでなく、神経組織の代謝や機能にまで影響を与え高次神経機能の低下や痴呆症の発症とも関連しており、血管系幹細胞数が多ければ神経機能が改善する可能性を示唆している。

実際、マウス脳梗塞モデルを用いた動物実験では、脳障害後に投与した血管系幹細胞が脳内で血管内皮細胞に分化して神経再生を亢進させることにより神経機能を改善させることが明らかとなっている。しかし、アルツハイマー型痴呆患者では末梢血中幹細胞数の増加が観察されており、これは血管系幹細胞の機能と神経機能との関連が高い可能性がある。これらの結果を基礎に、前向き経時的コホート研究においては、血管系幹細胞の形態学的検討を組み合わせた評価を行っており、痴呆症の病態解明や治療法の開発に直結する知見も得られると考えている。

## E. 結論

我々は慢性脳低灌流動患者における血管新生による側副血行維持に血管血球系幹細胞が関与すること<sup>1)</sup>、脳障害動物モデルにおいては、血管血球系幹細胞の移植が、脳機能の改善をもたらすことを明らかにしてきた<sup>2)</sup>。これらの研究は、脳障害患者に対する血管血球系幹細胞移植による治療法の可能性を示すものである。さらに現在、血管再生と神経再生との関連についての検討、および霊長類を用いた血管系幹細胞移植実験を開始している。今後は本研究で得られた知見と総合し発展させることにより脳障害患者に対する新しい治療法が確立されると考えている。

## F. 健康危惧情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Taguchi, A., Matsuyama, T., et al. (2004) Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function.

*Circulation*, 109:2972-2975.

2) Taguchi, A. Soma, T., Matsuyama, T., et al. (2004) Administration of CD34<sup>+</sup> cells post-stroke enhances angiogenesis and neurogenesis in a murine model.

*J Clin. Invest.* 114: 330-389.

### 2. 学会発表

1) 松山知弘, 田口明彦ら (2004) CD34 陽性細胞移植による脳梗塞の血管再生治

療の基礎的検討. 第 27 回日本神経科学大会, 第 47 回日本神経化学大会, 合同  
大会



図 1 : Isotype-matched IgGによる  
コントロール測定

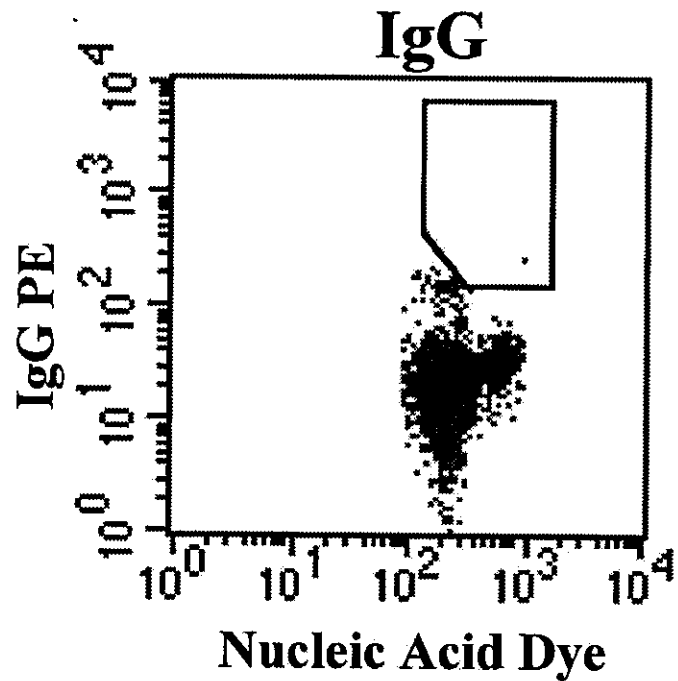


図 2 : Anti-CD34 Antibodyによる測定

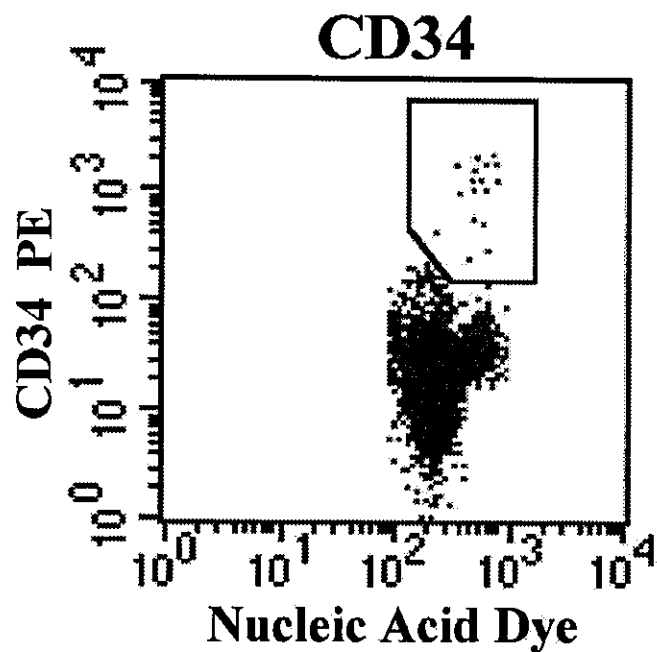


図3：細胞濃縮後のIgGによる  
コントロール測定

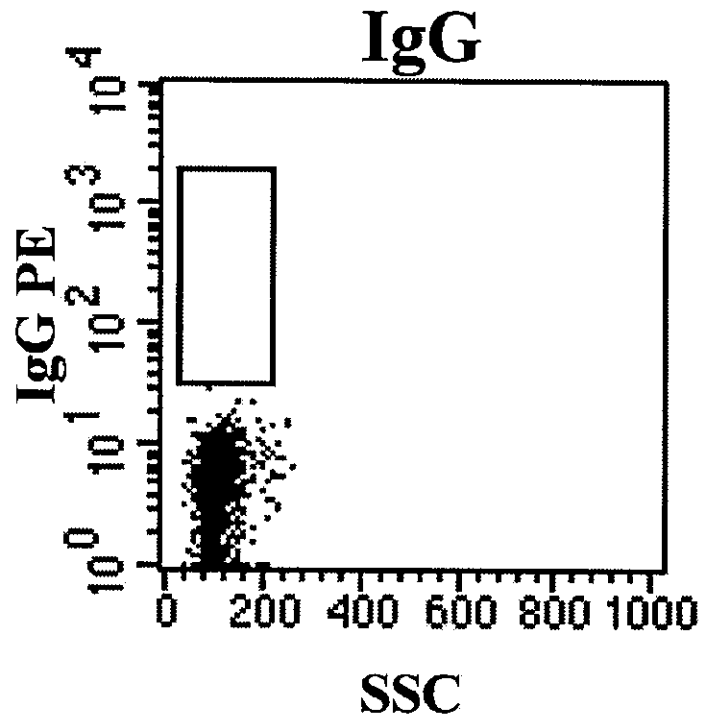


図4：Anti-CD133 Antibodyによる測定

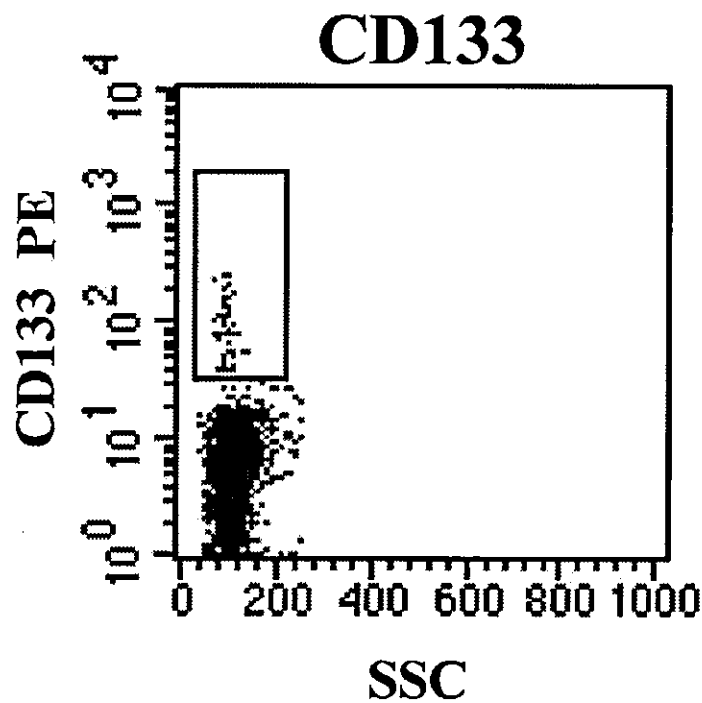


図5 : Anti-CD117 Antibodyによる測定

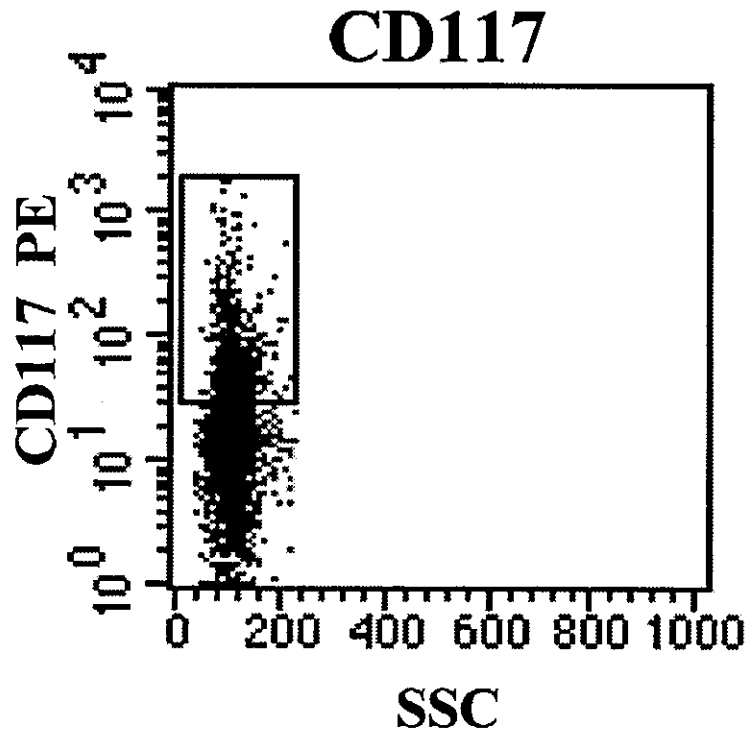


図6 : Anti-CD135 Antibodyによる測定

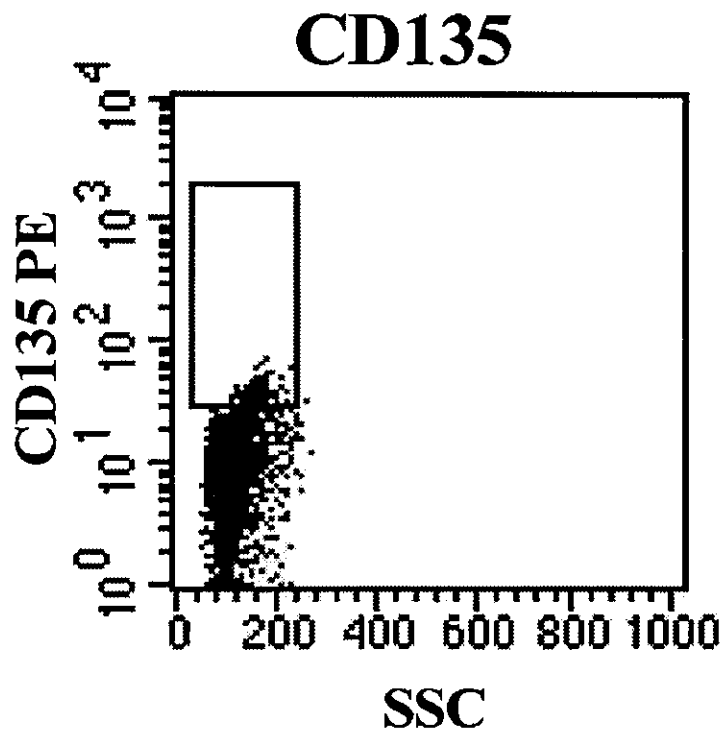


図 7 : 急性期脳梗塞後の末梢血中  
CD34陽性細胞の推移

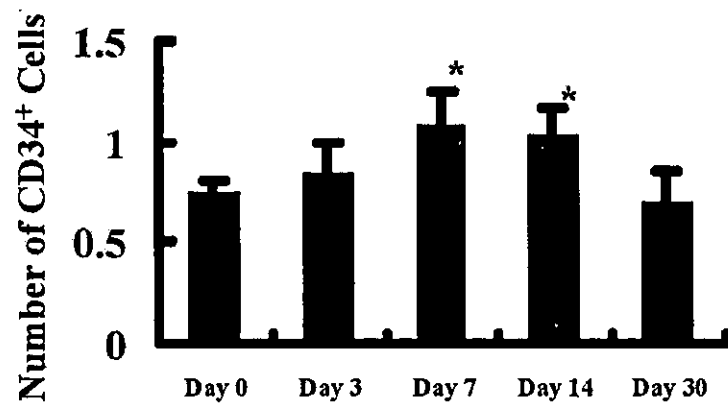


図 8 : 正常人における末梢血中  
CD34陽性細胞と年齢の相関

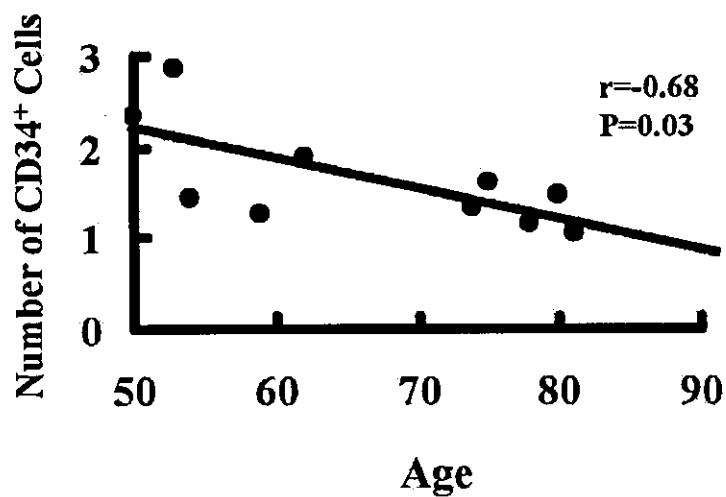


図 9 : 脳梗塞患者における末梢血中  
CD34陽性細胞と年齢の関連

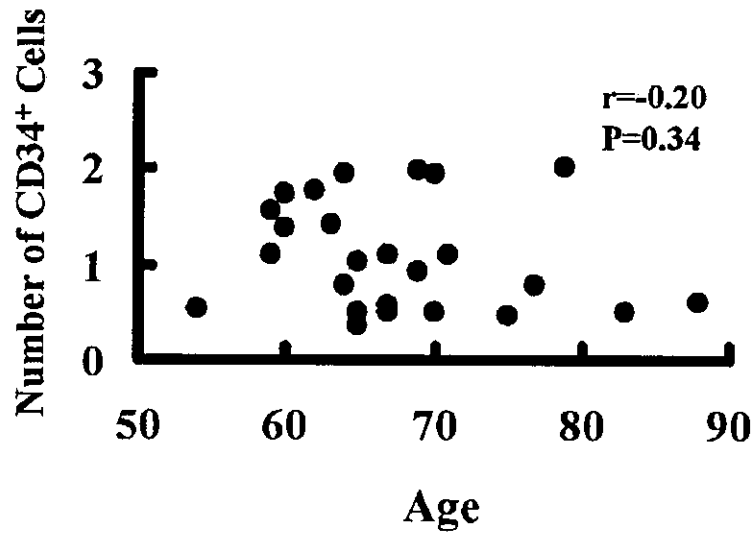


図 1 0 : 末梢血中幹細胞数と頸動脈  
動脈硬化性病変との関連

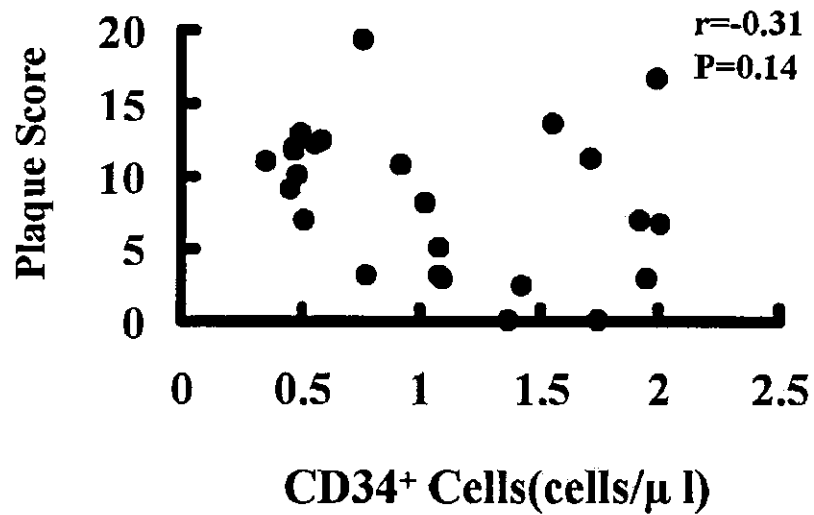


図 1 1 : 末梢血中CD34陽性細胞とMRI上観察される虚血性病変との関連

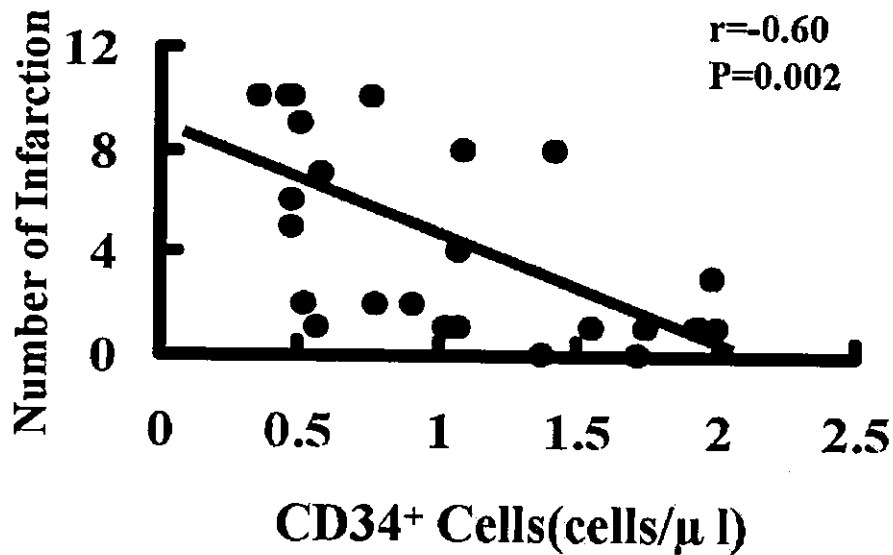


図 1 2 : 末梢血中CD133陽性細胞とMRI上観察される虚血性病変との関連

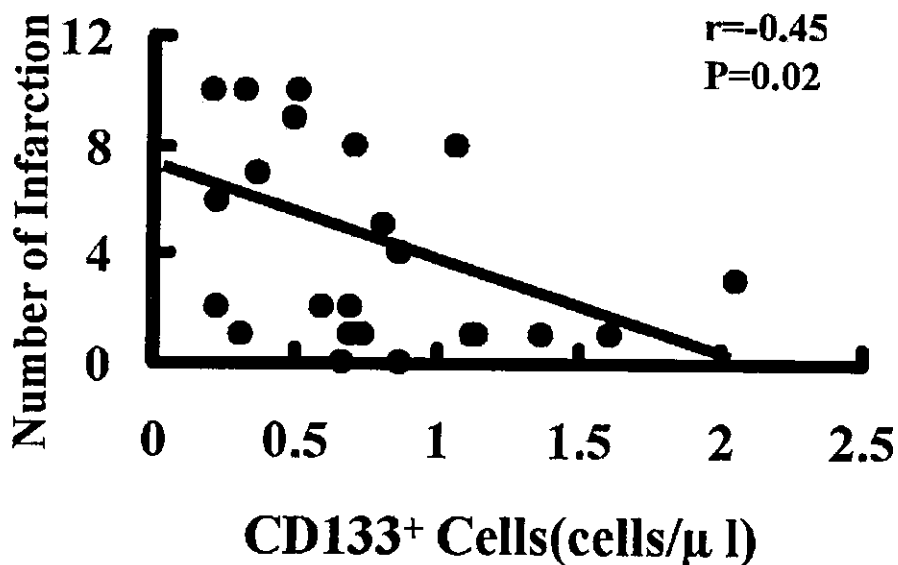


図 1 3 : 末梢血中CD117陽性細胞とMRI上観察される虚血性病変との関連

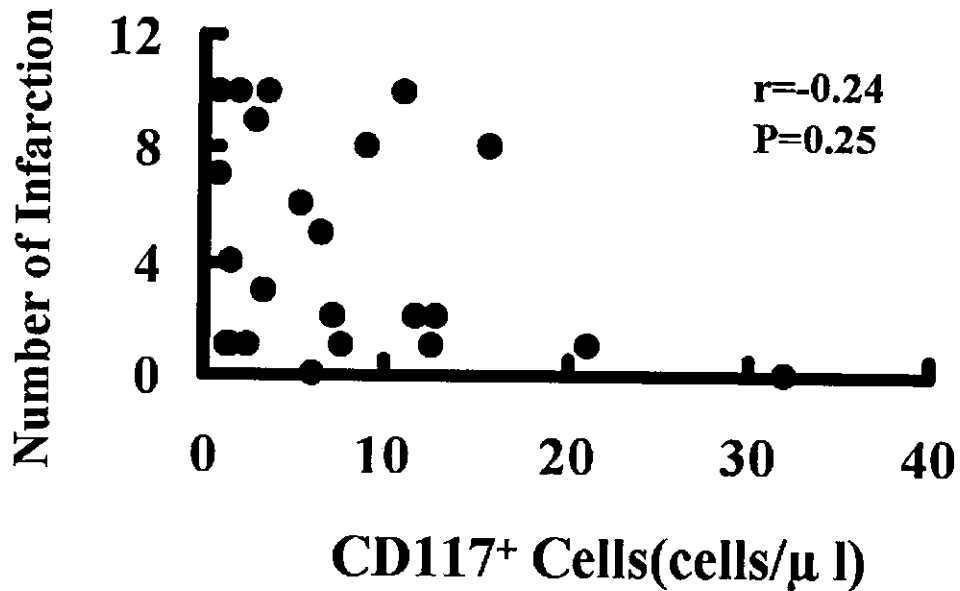


図 1 4 : 末梢血中CD135陽性細胞とMRI上観察される虚血性病変との関連

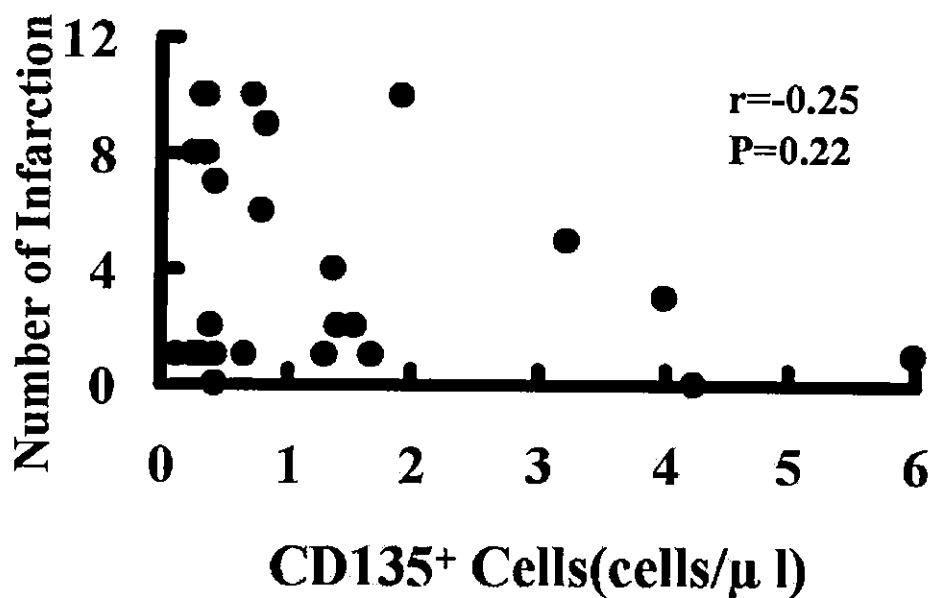


図 1 5 : 末梢血中CD34陽性細胞と  
脳血流との関連

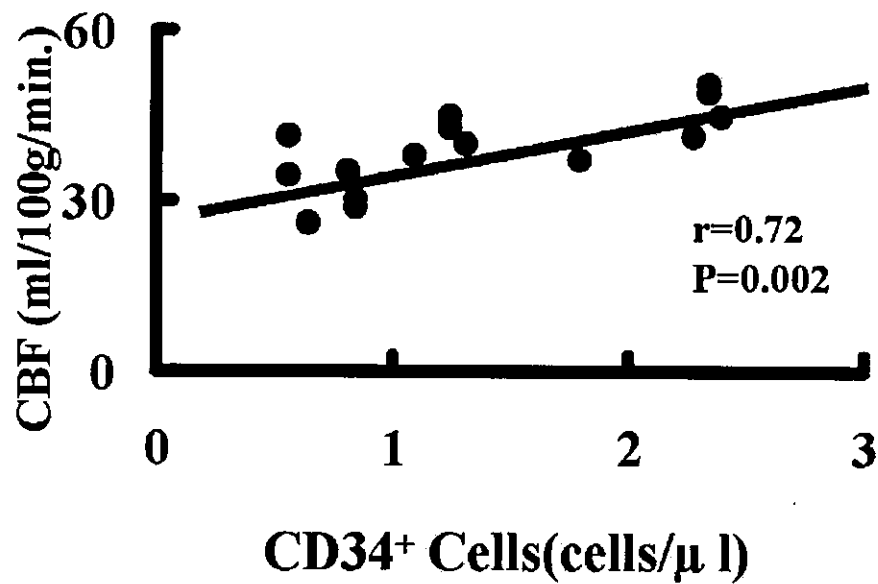


図 1 6 : 末梢血中CD34陽性細胞と  
脳血流との関連

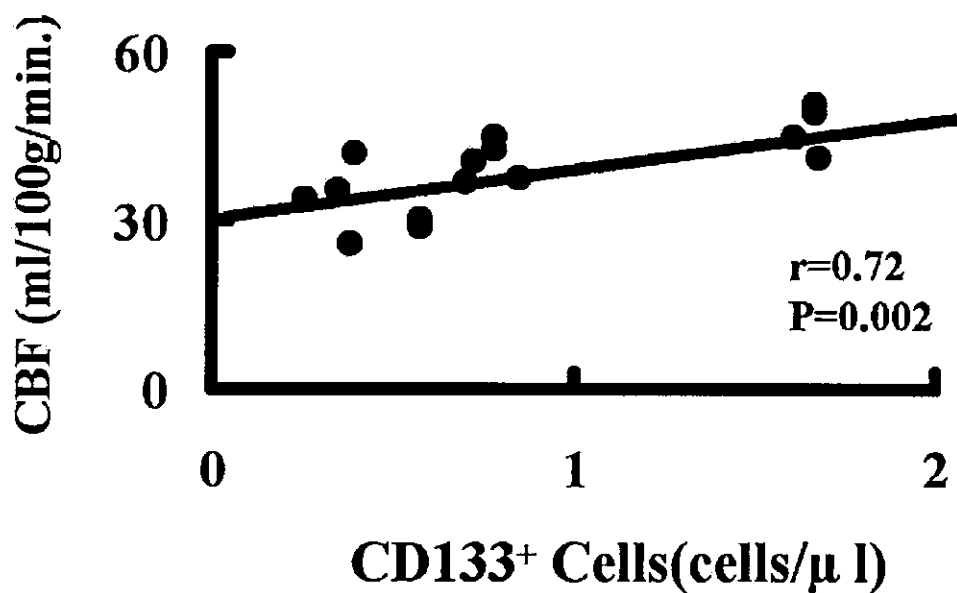




図 1 7 : 末梢血中CD34陽性細胞と  
酸素摂取率との関連

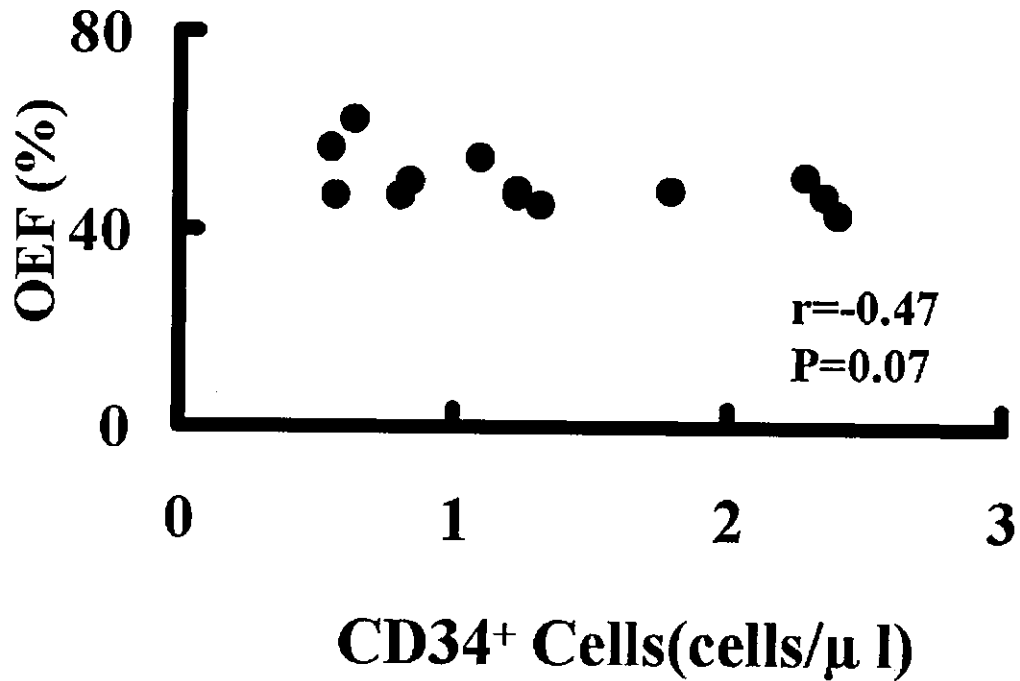


図 1 8 : 末梢血中CD34陽性細胞と  
脳酸素代謝量との関連

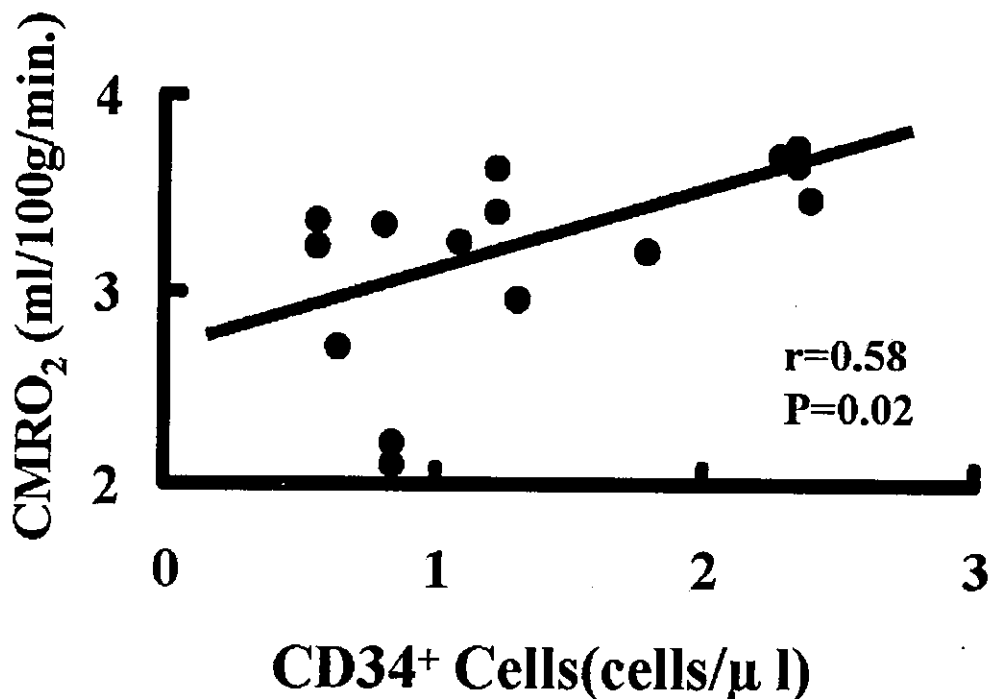


図 1 9 : 糖尿病患者における末梢血中  
CD34陽性細胞の減少

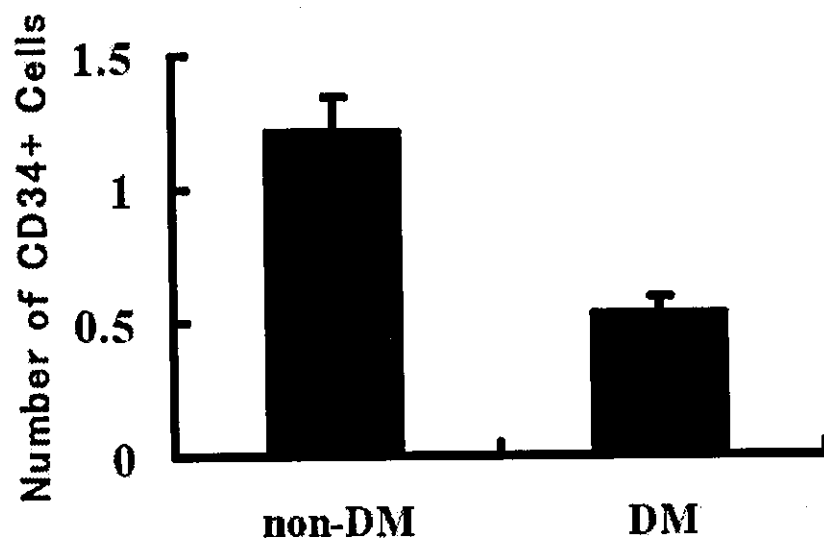


図 2 0 : 死細胞を除いた領域Aの設定

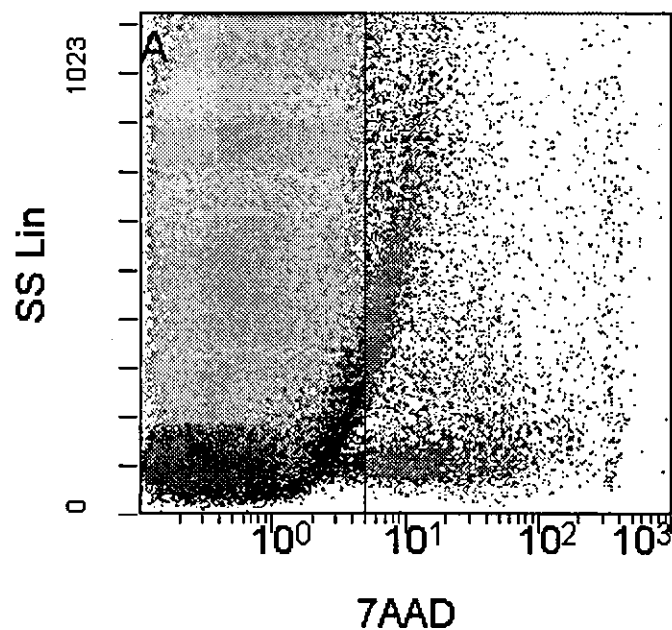


図 2 1 : すべてのCD45陽性細胞（白血球）を含めた領域Bの設定

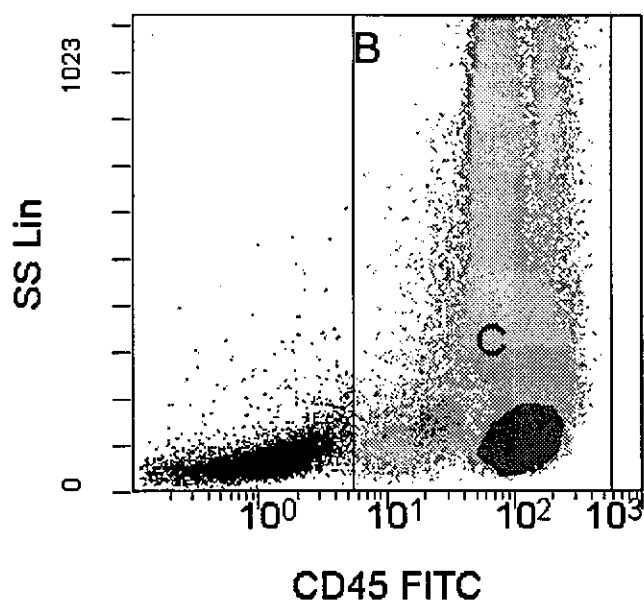


図 2 2 : CD34陽性の血液細胞前駆細胞 (HPCs) を含めた領域Dの設定

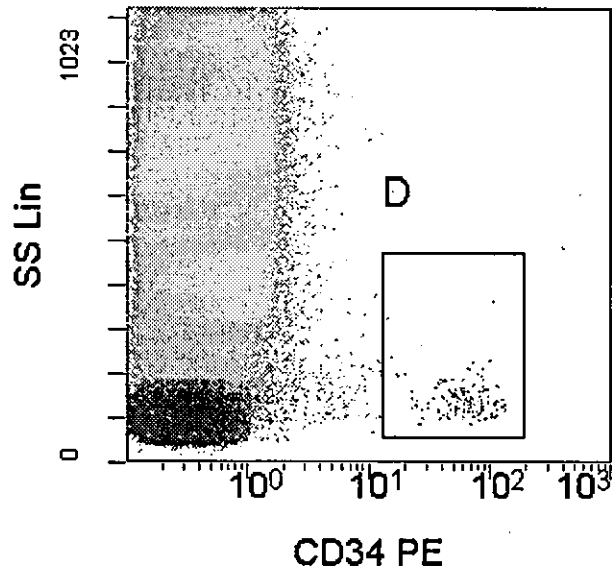


図 2 3 : CD34陽性HPCsの集団に領域Eを設定

