

厚生労働科学研究費補助金
痴呆・骨折臨床研究事業
(臨床研究実施チームの整備)

再生医療的手法による、脳血管性痴呆症
および虚血性脳血管障害に対する早期診断
および予防法の確立に関する研究
(臨床研究実施チームの整備)

平成16年度 総括研究報告書

平成 17 年 3 月

主任研究者 田口 明彦

国立循環器病センター研究所

目次

1	まえがき	1
2	研究組織	3
3	総括研究報告	5
4	臨床研究実施チーム報告	
4-1	脳血管障害における末梢血 CD34 陽性細胞定量法の開発	17
4-2	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	22
4-3	再生医療学的手法を用いた治療法の臨床応用に向けた検討	27
5	掲載論文	56

まえがき

現在わが国においては、他の諸国においては類を見ないほどの急速な高齢化社会を迎えており、それに伴う要介護者の急激な増加は日本の社会構造を根底から揺るがしかねない極めて深刻な社会問題である。平成13年度の厚生労働省国民生活基礎調査によると要介護者発生原因の10.7%が痴呆性疾患、27.7%が脳卒中などの脳血管障害であり、高齢者が健康で生きがいを持って生活し、かつ活力のある社会を保ち続けるためには、脳血管障害に起因する痴呆症や脳梗塞後遺症は克服すべき緊急の課題である。これらの疾患を克服するため、様々な研究が積み重ねられてきたが、脳梗塞に対する有効な治療法は発症後3時間以内の血栓溶解療法以外になく、脳血管性痴呆に対しては全く有効な治療手段がないのが現状である。また、閉塞性脳動脈病変に対する予防的外科的治療法に関しても、周術期の合併症発生率が高頻度であるため適応症例が非常に限局されていると共に、その脳卒中発症予防効果も不十分である。このため、従来の手法とは全く異なった観点からの革新的な手法を用いた早期診断法や予防法および治療法の確立が切望されている。

末梢血中の血管血球系幹細胞が同定されて以降、この幹細胞が血管の維持や修復に非常に重要な役割を果たしている事が明らかにされてきたが、これらの知見をもとに近年、従来の治療法では対処できなかった難治性の虚血性心疾患等に対して、再生医学的手法を用いた治療法の臨床応用が開始され、十分な治療的効果が示されている。脳血管の主要構成細胞である血管内皮細胞の平均寿命も3年程度であり、脳血管の維持や修復に関しても末梢血中の血管血球系幹細胞の重要性が示唆されてきた。これらの知見を背景に、末梢血中血管血球系幹細胞と脳梗塞の病態の関連に関する断面研究、および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を行っている。本研究の成果を応用、発展させることにより脳血管性痴呆症および虚血性脳血管障害発症における早期診断や予後の予測、疾患予備軍のスクリーニングが可能になると考えられる。また、循環器領域では末梢血中の血管血球系幹細胞の移植に向けた基礎研究が急速な勢いで進められているが、本研究では臨床研究実施チームにより、痴呆症や虚血性脳血管障害に対する新しい治療法として確立するための検討を行う。

国立循環器病センター研究所

田口 明彦

研究組織

統括主任研究者

田口 明彦 国立循環器病センター研究所 循環動態機能部 室長

臨床研究実施チーム

(a組)

成富 博章 国立循環器病センター 内科脳血管部門 部長

吉原 智之 国立循環器病センター 内科脳血管部門 専門臨床研究者

清水 葉子 国立循環器病センター 内科脳血管部門 専門臨床研究者

(b組)

長束 一行 国立循環器病センター 内科脳血管部門 医長

佐々木 勉 国立循環器病センター 内科脳血管部門 専門臨床研究者

山上 宏 国立循環器病センター 内科脳血管部門 専門臨床研究者

(c組)

森脇 博 国立循環器病センター 内科脳血管部門 医員

杉浦 史郎 国立循環器病センター 内科脳血管部門 専門臨床研究者

星 拓 国立循環器病センター 内科脳血管部門 専門臨床研究者

平成16年度厚生労働科学研究費補助金

痴呆・骨折臨床研究事業

総括研究報告書

再生医療的手法による、脳血管性痴呆症および虚血性脳血管障害に対する早期診断および予防法の確立に関する研究

主任研究者

国立循環器病センター研究所 田口 明彦

研究要旨

末梢血中の血管血球系幹細胞が同定されて以降、この幹細胞が血管の維持や修復に非常に重要な役割を果たしている事が明らかにされてきたが、これらの知見をもとに近年、従来の治療法では対処できなかった難治性の虚血性心疾患等に対して、再生医療学的手法を用いた治療法の臨床応用が開始され、十分な治療的効果が示されている。脳血管の主要構成細胞である血管内皮細胞の平均寿命も3年程度であり、脳血管の維持や修復に関しても末梢血中の血管血球系幹細胞の重要性が示唆されてきた。これらの知見を背景に今年度我々は①末梢血中血管血球系幹細胞と脳梗塞の病態の関連に関する小規模断面研究、および②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を開始した。

末梢血中血管血球系幹細胞と脳梗塞の病態の関連に関する小規模断面研究において、①末梢血中血管血球系幹細胞と頸動脈動脈硬化性病変との関連の検討

を行ったが、末梢血中の幹細胞分画である CD34、CD133、CD117、CD135 陽性細胞数と頸動脈動脈硬化性病変や内膜肥厚に関する有意な相関関係は見られなかった。頸動脈病変の進展には物理的なずり応力やマクロファージなど、他の因子が大きく関与するため、末梢血中幹細胞数の減少による動脈硬化発症の影響は比較的少ないと考えられた。次に②脳循環維持機構やその修復機構の破綻は脳虚血性病変と関連していると考え、MRI 上観察される虚血性病変と末梢血中幹細胞の関連について検討を行った。その結果、血管内皮前駆細胞系の幹細胞を多く含む CD34、CD133 抗原陽性細胞数の減少が、脳梗塞巣の増加と有意に関連している一方、血管内皮前駆細胞と関連の薄い CD117 抗原および CD135 抗原細胞数との有意な関連は見られないことを明らかにした。さらに③脳循環代謝機能に対する末梢血幹細胞関与の検討のため、PET を用いて脳主幹動脈閉塞あるいは高度狭窄のある患者の評価を行った。その結果、血管血球系幹細胞の属する分画である CD34、CD133 抗原陽性細胞数の減少が、慢性虚血部位の脳血流量の低下に有意に関連しており、側副血行路の形成低下や血管反応性の低下など、血流血管維持機構の低下と関連していると考えられた。しかも、CD34 抗原陽性細胞数減少患者においては、慢性虚血部位における酸素摂取率の反応性の上昇は認められず、末梢血中血管血球系幹細胞数の低下が血管内皮機能の低下と共に神経機能の低下にも関連していることを明らかにした。

また、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においては、CDR や MMSE などの脳神経機能の評価と同時に末梢血中 CD34 陽性細胞数の計測を行い、500 例以上の症例の登録を行った。これらの症例は来年度においても経時的な評価を行い、末梢血中血管血球系幹細胞数との関連についての詳細な検討を行う。

背景および目的

現在わが国においては、他の諸国においては類を見ないほどの急速な高齢化社会を迎えており、それに伴う要介護者の急激な増加は日本の社会構造を根底から揺るがしかねない極めて深刻な社会問題である。脳血管障害に起因する痴呆症や脳梗塞後遺症はその主要な原因の一つであり、高齢者が健康で生きがいを持って生活し、かつ活力のある社会を保ち続けるための克服すべき緊急の課題である。これらの疾患を克服するため、様々な研究が積み重ねられてきたが、脳梗塞に対する有効な治療法は発症後 3 時間以内の血栓溶解療法以外になく、脳血管性痴呆に対しては全く有効な治療手段がないのが現状であり、従来の治療法とは全く異なった観点からの革新的な手法を用いた早期診断法や予防法および治療法の確立が切望されている。

従来の治療法では対処できなかった難治性の虚血性心疾患や末梢動脈閉塞症に対しては、まったく新しい手法である血管血球系幹細胞を用いた治療法の臨床応用が既に開始され、その十分な治療的効果も明らかにされている。また、末梢血中の血管血球系幹細胞を増加させる治療法の開発に向け、臍帯血中幹細胞の移植、内因性幹細胞の動員、*in vitro* での幹細胞増殖培養等様々な研究が非常に多くの施設で行われており、近い将来に臨床応用されると考えられている。それらの医療技術を虚血性脳血管障害の分野に応用するためには、脳障害患者における血管血球系幹細胞の動態と障害脳の病態に関する検討が必要不可欠であり、本研究は障害脳に対する再生医学的手法を用いた治療法の臨床応用に向けた重要な基盤研究となると考えている。本研究はこれらの成果を通じて我が国の要介護者の大幅な減少をもたらすことが可能であり、高齢者が健康で自立して生活する、活力のある社会を保ち続けることに大きく貢献することができると考えている。

また、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。

研究方法

1. 末梢血中血管血球系幹細胞と脳梗塞の病態の関連に関する小規模断面研究

A. 研究計画書の作成および審査

本研究は患者由来のサンプルを用いた臨床研究であるため、ヘルシンキ宣言に基づく倫理指針を遵守した研究計画書を策定し、国立循環器病センター高度先駆的医療・研究専門審査会および倫理委員会にて承認後、脳血管障害患者における末梢血幹細胞と脳虚血病態の関連の検討についての検討を行った。また、本研究への脳血管障害患者のエントリーは十分なインフォームドコンセントに基づいた本人の意思で本研究に参加して頂いた。

B. 対象患者群

急性期患者群：虚血性脳血管障害発症後 24 時間以内に採血が可能な患者。

慢性期患者群：虚血性脳血管障害や虚血性心疾患などの循環器系虚血性疾患発症後 30 日以上経過した患者。女性においては閉経後の患者のみを対象とし、また感染症など末梢血中の血球成分に、大きな影響を与える可能性のある疾患を有する患者も除外した。

C. 末梢血中幹細胞の解析

1) CD34 陽性細胞の末梢血中絶対数の測定

各患者より 3ml のヘパリン加採血を行い、内部標準ビーズを用いて、

International Society of Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) のガイドライン¹⁾に準拠した CD34 陽性細胞の絶対数測定を行った。また、CD34 細胞の絶対数の正確な測定のため①threshold 設定に nucleic acid dye を用い②洗浄ステップの排除③内部標準としてのビーズの添加④リバースパイペット法による正確な定量化⑤CD34 抗体と抗体価や蛍光強度が一致するコントロール抗体の使用⑥3 回測定による平均値の採用、を行った (図 1 : Isotype-matched Control、図 2 : Anti-CD34 Antibody)

2) 他の幹細胞系表面マーカー陽性細胞数の測定

CD34 陽性細胞以外の幹細胞系表面マーカーとして①造血前駆細胞、血管内皮前駆細胞系の CD133 抗原②Stem Cell Factor 抗原である CD117 抗原③初期骨髄系および B 細胞系前駆細胞を中心に発現する CD135 抗原を用いた。これらの細胞数の測定には、抗 CD2、CD3、CD14、CD16、CD19、CD24、CD56、CD66b 抗体を用いて lineage removal を行い、成熟細胞を除去した後に、細胞数のカウントを行った (図 3 : IgG Control、図 4 : Anti-CD133 Antibody、図 5 : Anti-CD117 Antibody、図 6 : Anti-CD135 Antibody)。また、CD34 陽性細胞において、KDR、TIE、TEK 発現細胞の解析を行った。

D. 脳梗塞患者の病態評価

① 頸動脈における動脈硬化性変化の評価

7.5MHz のリニア型プローベを用いて頸部超音波による総頸-内頸動脈における動脈硬化の定量的評価²⁾を行った。

② 脳虚血性病変の評価

Blinded Investigator による脳 MRI (T1、T2、FLAIR 画像) の評価を行い、虚血によると考えられる病変の量的評価を行った。

③ 脳血流代謝機能の評価

脳主幹動脈閉塞あるいは高度狭窄のある患者には PET(Positron Emission Tomography)を用いて脳血流量 (CBF)、脳血液量 (CBV)、酸素摂取率 (OEF) および酸素代謝量 (CMRO₂) の定量的測定³⁾を行った。

2. 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

A. 研究計画書の作成および審査

末梢血中血管血球系幹細胞と脳梗塞の病態の関連に関する小規模断面研究と同様に国立循環器病センター高度先駆的医療・研究専門審査会および倫理委員会にて承認後、本研究への脳血管障害患者のエントリーは十分なインフォームドコンセントに基づいた本人の意思で本研究に参加して頂いた。同様に、兵庫医科大学医学部、星ヶ丘厚生年金病院および国立病院機構大阪南医療センターにおいても、施設内倫理委員会における承認後にサンプル収集を開始した。

B. 対象患者群

- ①脳血管性痴呆症、混合型痴呆症およびアルツハイマー型痴呆症患者
- ②慢性期虚血性脳血管障害患者
- ③患者脳梗塞危険因子を有する患者

C. 血管血球系幹細胞解析方法

- ①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病院に集積。
- ②測定による変動や誤差を最小限とするために、我々は非常に精度の高い測定方法開発した。(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)

D. 脳障害患者の病態評価(症例報告書参照)

- ①脳障害による機能障害の評価

Barthel Index、modified Rankin Scale、NIHSS、MMSE、CDR、DSM-III-R による
痴呆の判定

- ②経過中の脳血管障害（脳梗塞、TIA および脳出血等）の発症
- ③経過中の脳血管障害以外の虚血性循環器疾患（心筋梗塞、狭心症および ASO 等）の発症および死亡(全ての原因を含む)

E. エンドポイント

登録時における末梢血中 CD34 陽性細胞数と下記項目に関する関連を検討する。

主要評価項目

- ① 1年以内の脳血管障害再発
- ② 登録時と1年後の比較による Barthel Index の低下

副次評価項目

- ① 初回評価時と1年後の比較による NIHSS、modified Rankin Scale、MMSE、CDR の低下
- ② 初回評価時と2年後の比較による Barthel Index、NIHSS、modified Rankin Scale、MMSE、CDR の低下
- ③ 登録時における NIHSS、modified Rankin Scale、Barthel Index、MMSE、CDR と CD34 陽性細胞の比例的関連
- ④ 2年以内の脳血管障害再発
- ⑤ 1年および2年以内の痴呆症の発症
- ⑥ 1年および2年以内の脳血管障害以外の虚血性循環器疾患の発症、および死亡

研究結果

1. 末梢血中血管血球系幹細胞と脳梗塞の病態の関連に関する小規模断面研究

A. 末梢血幹細胞測定の実験的再現性の検討

最初に我々の測定系の検討を行い、脳梗塞患者における Cumulative intra-assay coefficient of variation が CD34、CD133、CD117、CD135 陽性細胞測定においてそれぞれ 14%、13%、14%、15%であり、臨床検査における許容範囲である 15%以内であることを確認した。また、正常人ボランティアを用いた検討においては、10 日の間隔をおいて測定した CD34、CD133、CD117、CD135 陽性細胞測定において、Test-retest intraclass correlations がそれぞれ 0.88、0.75、0.86、0.86 であり、健常人においては測定日による変動が少ないことを明らかにした。

B. 急性脳虚血後の末梢血中 CD34 陽性細胞数の経時的変化

急性期脳梗塞患者末梢血中の CD34 陽性細胞数の経時的検討では、虚血後 7 日および 14 日の時点で有意な上昇を認め、梗塞後 30 日にはほぼ、虚血直後の値に戻っていた (図 7)。これらの結果より、慢性期患者に関しては梗塞後 30 日以上経た時点で採血を行った。

C. 末梢血中 CD34 陽性細胞数と年齢の検討

正常対照群では末梢血中の CD34 陽性細胞数は年齢により低下する傾向が見られたが (図 8)、脳梗塞患者群では年齢による有意な減少は見られなかった (図 9)。

D. 慢性期脳梗塞患者における末梢血中幹細胞数と脳血流動態の関連

最初に末梢血中幹細胞数と plaque score による頸動脈動脈硬化性病変との関連を検討した。末梢血中の CD34 (図 10)、CD133、CD117、CD135 陽性細胞数と頸動脈動脈硬化性病変や内膜肥厚に関する有意な相関関係は見られなかった。頸動脈病変の進展には物理的なずり応力やマクロファージなど、他の因子が大きい

く関与するため、末梢血中幹細胞数の減少による動脈硬化発症の影響は比較的少ないと考えられた。

そこで次に、脳循環維持機構やその修復機構の破綻は脳虚血性病変と関連していると考え、MRI 上観察される虚血性病変と末梢血中幹細胞の関連について検討を行った。その結果、血管内皮前駆細胞系の幹細胞を多く含む CD34 抗原陽性細胞数 (図 11)、CD133 抗原陽性細胞数 (図 12) の減少が、脳梗塞巣の増加と有意に関連している一方、血管内皮前駆細胞と関連の薄い CD117 抗原 (図 13) および CD135 抗原細胞数 (図 14) との有意な関連は見られなかった。

E. 脳主幹動脈病変を有する患者における末梢血中幹細胞数と脳血流動態の関連

次に、脳循環代謝機能に対する、末梢血中幹細胞関与の検討のため、PET を用いて脳主幹動脈閉塞あるいは高度狭窄のある患者の評価を行った。その結果、血管血球系幹細胞の属する分画である CD34 抗原陽性細胞数 (図 15)、CD133 抗原陽性細胞数 (図 16) の減少が、慢性虚血部位の脳血流量の低下に有意に関連しており、側副血行路の形成低下や血管反応性の低下など、血流血管維持機構の低下と関連していると考えられた

また CD34 抗原陽性細胞数減少患者においては、慢性虚血部位における酸素摂取率の反応性の上昇は認められず (図 17)、その結果酸素代謝量の低下が認められた (図 18)。末梢血中血管内皮前駆細胞の低下が血管内皮機能の低下と共に神経機能の低下にも関連していることが示唆された。

F. 動脈硬化の危険因子と末梢血中幹細胞の関連の検討

動脈硬化の危険因子との関連では高血圧や高脂血症患者では、末梢血中の血管血球系幹細胞の有意な減少は認められなかったが、糖尿病患者において、有意な CD34 陽性細胞数の減少を認めた (図 19 [図 1-19 は研究成果発表文献

*Circulation. Taguchi et al.*より引用、改変]。)

2. 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

各種痴呆症患者および虚血性脳血管障害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た。平成17年3月の時点で500名以上の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。

考察

末梢血中血管血球系幹細胞と脳梗塞の病態の関連に関する断面研究では、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を示したが、PETを用いた検討では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、Blood Brain Barrierを形成す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た。脳血管を構成する血管内皮細胞の平均寿命は約3年であることが報告されているが、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いる可能性を示唆している。

動脈硬化の危険因子との関連の検討においては、糖尿病患者群で著明な末梢血中血管血球系幹細胞数の減少が観察されており、これらは糖尿病性合併症である微小循環障害の発症と関連している可能性が高いと考えている。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、糖尿病患者における血管内皮機能や眼底検査、腎機能検査を組み合わせた評価を行っており、糖尿病合併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。

結論

我々は末梢動脈閉塞症患者に自己骨髄由来の血管血球系幹細胞を移植することにより虚血症状の改善することを示すとともに⁴⁾、脳虚血動物モデルにおいても、血管血球系幹細胞の移植が、虚血の改善をもたらすことを明らかにしてきた⁵⁾。これらの研究は、脳梗塞患者に対する血管血球系幹細胞移植の可能性を示唆するものであり、我々は現在、脳虚血後の血管再生と、神経再生や機能回復との関連についての検討、および霊長類を用いた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梗塞患者に対する新しい治療法が確立されると考えている。

文献

- 1) Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, et al. The ISHAGE Guidelines for CD34⁺ Cells Determination by Flow Cytometry. *Journal of Hematotherapy* 5:213-226 (1996)
- 2) Sasaki T, Watanabe M, Nagai Y, et al. Association of plasma homocysteine concentration with atherosclerotic carotid plaques and lacunar infarction. *Stroke* 33:1493-6 (2002)
- 3) Hirano T, Minematsu K, Hasegawa Y, et al. Acetazolamide reactivity on ¹²³I-IMP single photon emission computed tomography in patients with major cerebral artery occlusive disease: correlation with positron emission tomography parameters. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 14: 763-770 (1994)
- 4) Taguchi A, Ohtani M, Soma T, et al. Therapeutic Angiogenesis by Autologous Bone-marrow Transplantation in a General Hospital Setting. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 25: 276-278 (2003)
- 5) Taguchi A, Soma T, Tanaka H, et al. Administration of CD34⁺ cells post-stroke enhances angiogenesis and neurogenesis in a murine model *J Clin. Invest.* 114: 330-389 (2004)

厚生労働科学研究費補助金（痴呆・骨折臨床研究事業）研究報告書

臨床研究実施チーム（a組）

脳血管障害における末梢血 CD34 陽性細胞定量法の開発

成富 博章 国立循環器病センター 内科脳血管部門 部長
吉原 智之 国立循環器病センター 内科脳血管部門 専門臨床研究者
清水 葉子 国立循環器病センター 内科脳血管部門 専門臨床研究者

研究要旨

血管維持と血管新生において、末梢血中に存在する CD34 陽性細胞を含め、血管内皮前駆細胞 (EPCs) の役割が指摘されている。本研究では CD34 陽性細胞が少ない脳血管障害患者においても末梢血中の CD34 陽性細胞の絶対数を容易に測定できる新しい方法の開発を、国立病院機構大阪南医療センター相馬らと共にを行った。

A. 研究目的

血管維持と血管新生において、末梢血中に存在する CD34 陽性細胞を含め、血管内皮前駆細胞 (EPCs) の役割が指摘され始めている。CD34 陽性細胞はまた、虚血性疾患で成長因子、血管再生誘導因子として血管恒常性を与えるものともされている。さらに、心臓性虚血 (cardiac ischemia) や下肢への細胞移植といった臨床的試みも、有効な結果があるとしてなされている。以上のことに基づき、脳血管障害患者の循環血液中の EPCs と CD34 陽性細胞も注目されることとなり、血管機能レベルとの強い関係が報告された。しかしながら、EPCs と CD34 陽性細胞の評価法は簡単でもなければ、単純なものでもない。ましてや、脳血管障害

患者の CD34 陽性細胞は少ないので、日常的に FACS 解析することは不可能である。本報告書において、我々は CD34 陽性細胞が少ない患者でもその絶対数を容易に測定できる新しい方法を開発したので報告する。

B. 研究方法

本研究は大阪南医療センター倫理委員会及び国立循環器病センター高度先駆的医療・研究専門委員会および倫理委員会により認可され、すべての検体はインフォームドコンセントに基づき採取した。実験結果は平均±標準誤差(SE; standard error)で表記する。

末梢血の解析方法

脳血管障害患者より 3ml の末梢血をヘパリン採血した。まず最初に、ProCount (BD Bioscience, San Jose, California, USA) と Stem-Kit (Beckman Coulter, Marseille, France) の標準プロトコールを用いて CD34 陽性細胞を測定した。これらのプロトコールは ISHAGE ガイドラインに基づき、動員末梢血中の CD34 陽性細胞数の測定に用いられている。次に、CD34 陽性細胞のカウント数をあげるために、Stem-Kit のプロトコールを以下のように改良した。サンプル量、抗体量、溶血試薬量を倍量にした。標準粒子コントロールビーズ (Stem count: Beckman Coulter) を 30 μ l 加えた後、450g で 5 分間遠心し、注意して 3860 μ l の上澄みを取り除いた。サンプルを Coulter CYTOMICS FC500 & XL-system II software (Beckman Coulter) で 6 分間測定した。

まず最初に、全細胞から、7-AAD で染まっている細胞 (死細胞) を除いた領域 A を設定した後 (図 20)、領域 A の細胞から、すべての CD45 陽性細胞 (白血球) をふくめた領域 B を設定し (図 21)、領域 C はリンパ球 (bright CD45, low Side

Scatter) のみに設定した。次に、領域 A と B の細胞から、CD34 陽性の血液細胞前駆細胞 (HPCs) をふくめた領域 D を設定し (図 22)、領域 A と B と D の細胞から、CD34 陽性 HPCs (low side scatter and low to intermediate CD45 staining) の集団を領域 E に設定することにより (図 23)、CD45 で明るく染まっている細胞を除いた。そして、領域 A と C の細胞から、混在しているかもしれない血小板を除くために、リンパ球・芽球の領域 F を設定した (図 24)。領域 A と B と D と E の細胞から、領域 F に存在する細胞のみを CD34 陽性 HPCs とした (図 25)。すべての蛍光色素や検出器は ISHAGE ガイドラインによる。全細胞から、標準粒子コントロールビーズである領域 G を設定した (図 26)。

C. 研究結果

CD3 陽性細胞カウント数の増加

動員末梢血中の白血球分画における CD34 陽性細胞は約 0.2-0.5% とされている。最初に、ProCount と Stem-Kit を用いて心臓血管疾患 (cardiovascular disease) 患者の末梢血中の CD34 陽性細胞を測定した (table 1)。白血球分画の CD34 陽性細胞パーセントは、 $0.024 \pm 0.003\%$ (range: 0.012%-0.06%; ProCount) と $0.021 \pm 0.001\%$ (range: 0.011%-0.032%; Stem-Kit) であった。細胞のカウント数は再現性を決めるにあたり、主な要因の一つである。そこで我々は CD34 陽性細胞の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。そこで従来の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 ± 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