

図 2 0 : 死細胞を除いた領域Aの設定

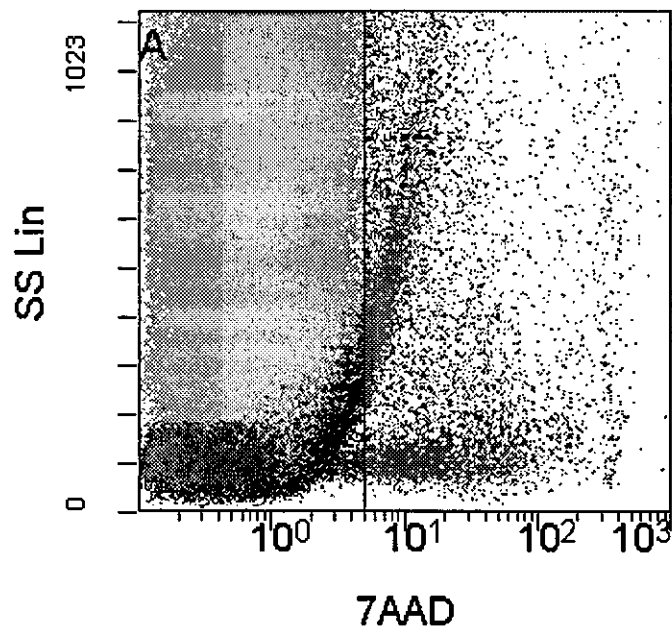


図 2 1 : すべてのCD45陽性細胞（白血球）を含めた領域Bの設定

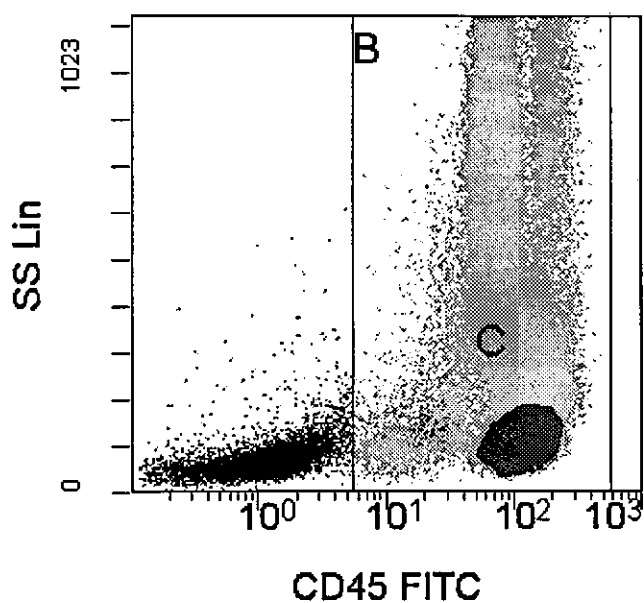


図 2 2 : CD34陽性の血液細胞前駆細胞 (HPCs) を含めた領域Dの設定

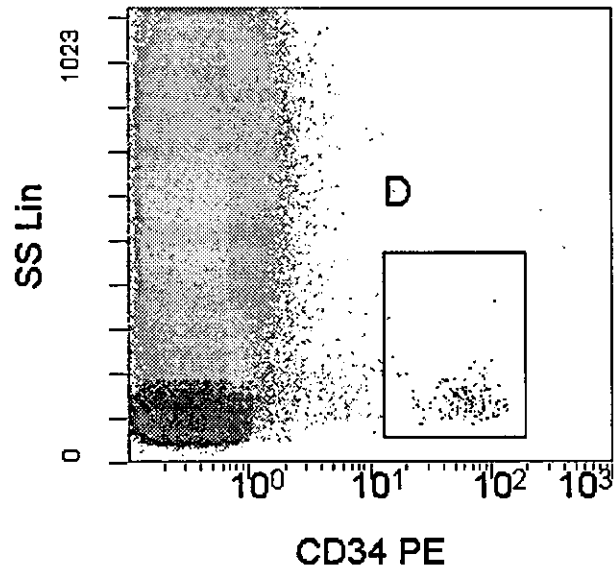


図 2 3 : CD34陽性HPCsの集団に領域Eを設定

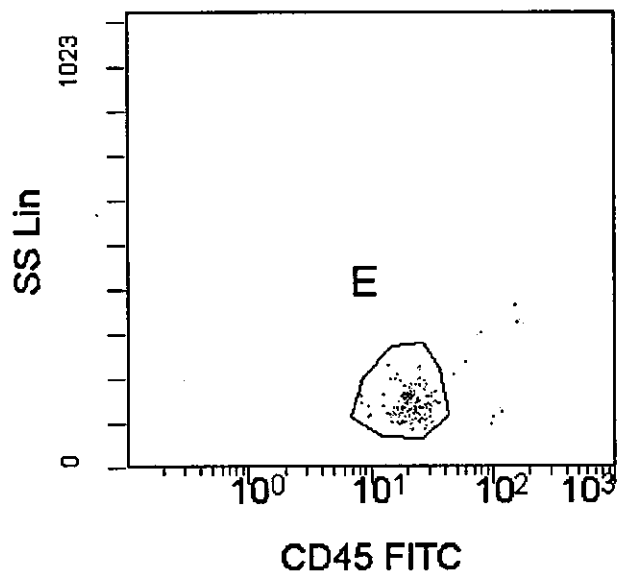


図 2 4 : リンパ球・芽球の領域Fを設定

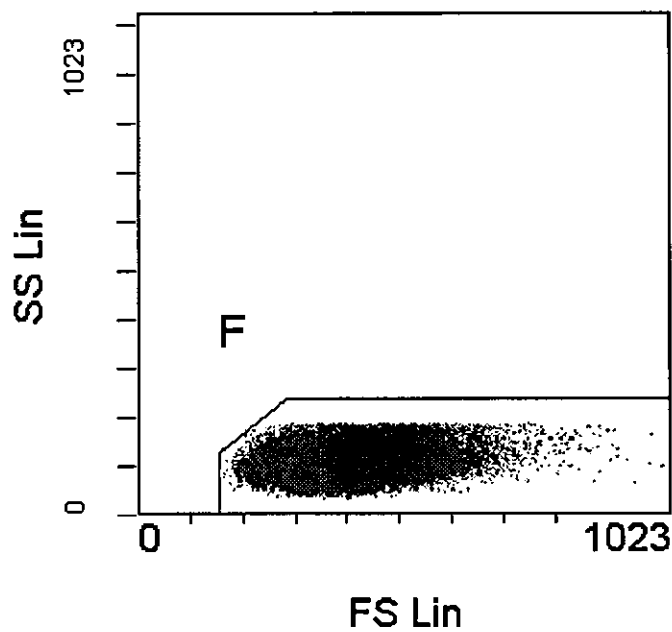


図 2 5 : 領域Fに存在する細胞のみ
CD34陽性HPCsとしてカウント

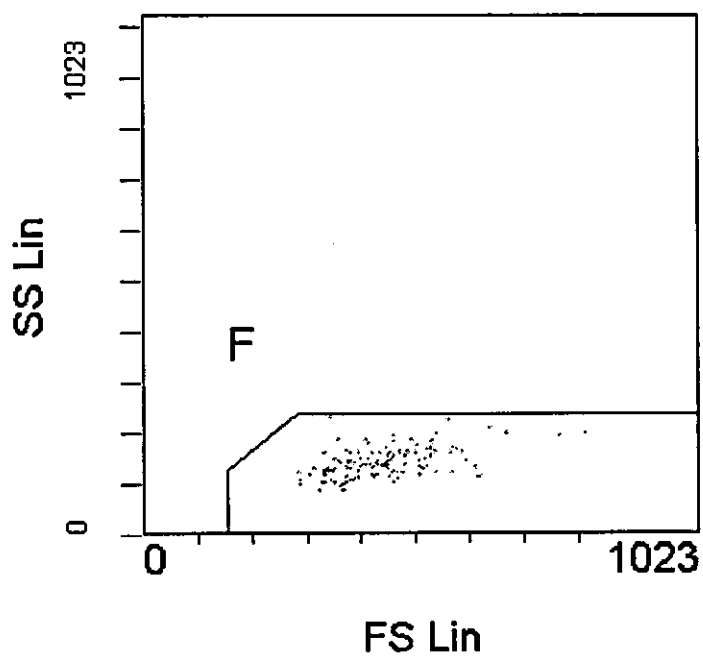


図 2 6 : 標準粒子コントロールビーズの
領域Gの設定

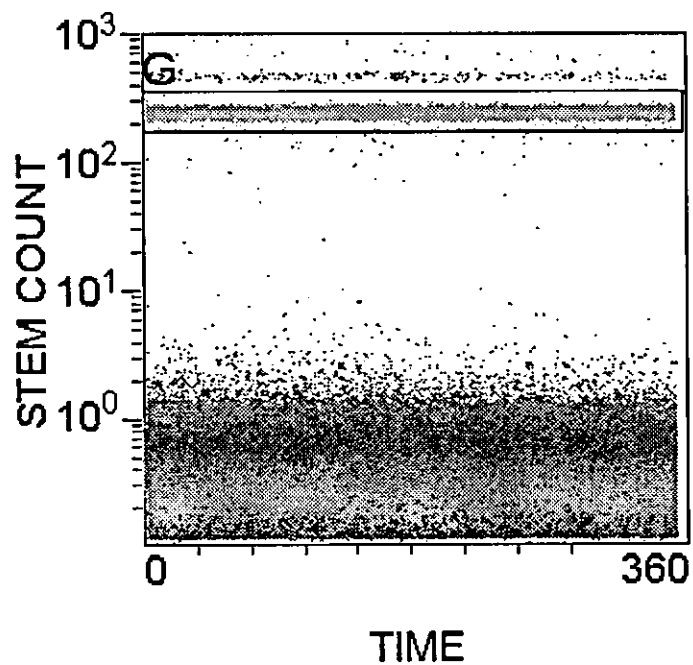
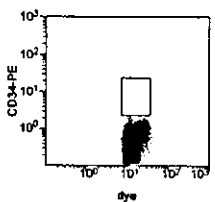
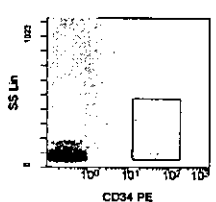
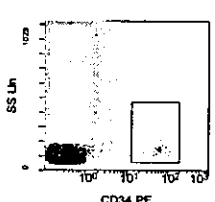


表 1 : 新しいプロトコールによる
変動係数の減少

| | ProCount | Stem-Kit | Improved Protocol |
|---|---|--|---|
| |  |  |  |
| Actual CD34+ cells counts | 16 ± 1 (range: 10–31) | 34 ± 4 (range: 16–58) | 174 ± 18 (range: 88–404) |
| Percentage of CD34+ cells in leukocytes (%) | 0.024 ± 0.003 (range: 0.012–0.046) | 0.021 ± 0.001 (range: 0.011–0.032) | 0.019 ± 0.002 (range: 0.014–0.038) |
| Circulating CD34+ cells (cells/μl) | 0.82 ± 0.05 | 0.81 ± 0.06 | 0.88 ± 0.06 |
| Cumulative intra-assay coefficient of variation (%) | 30.3 | 25.7 | 7.4 |

慢性期脳血管障害患者における
末梢血中 CD34 陽性細胞数と患者予後に関する
経時的コホート研究

症例報告書
〈登録時評価用〉

医療機関名

1. 国立循環器病センター
2. 国立病院機構大阪南医療センター
3. 星丘厚生年金病院
4. 兵庫医科大学医学部

症例番号 _____

担当医師名 _____

研究協力者名 _____

CD34 陽性細胞採血日

平成 年 月 日

患者背景

カルテ番号：

名前：

性別： 男・女

生年月日：明治 大正 昭和 年 月 日 年齢： 歳

基礎疾患

- 糖尿病 (有, 無)
- 高血圧 (有, 無)
- 高脂血症 (有, 無)
- 喫煙 (有, 無, 過去に禁煙)
- 虚血性心疾患 (有, 無)
(心筋梗塞, 狭心症)
- 四肢動脈閉塞症 (有, 無)
- 腎機能障害 (有, 無)
(血中クレアチニン濃度 2.0 以上)

介護保険利用 (有, 無)

主な内服薬

- 降圧薬 (Ca Blocker, β -Blocker, ACE, 利尿薬、その他)
- 高脂血症治療薬 (スタチン, その他)
- 糖尿病薬 (SU 剤, インスリン、その他)
- その他

① 〈脳梗塞病型分類〉

アテローム血栓性梗塞, ラクナ梗塞, 心原性脳塞栓, 多発性脳梗塞, 奇異性脳塞栓症、
動脈解離による脳梗塞、脳血管性痴呆症、その他： _____

② 〈Barthel Index〉

| 項 目 | 点 数 | 記 述 | 判 定 基 準 |
|--------------------|-----|--------|--|
| 1. 食事 | 10 | 自立 | 皿やテーブルから自力で食物をとって、食べることができる。自助具を用いてもよい。食事を妥当な時間内に終える。 |
| | 5 | 部分介助 | なんらかの介助・監視が必要（食物を切り刻む等） |
| | 0 | 全介助・不能 | |
| 2. 車椅子とベッド 間の移乗 | 15 | 自立 | すべての動作が可能（車いすを安全にベッドに近づける。ブレーキをかける。フットレストをもちあげる。ベッドへ安全に移る。臥位になる。ベッドの縁に腰かける。車椅子の位置を変える。以上の動作の逆）。 |
| | 10 | 最小限の介助 | 上記動作（1つ以上）で最小限の介助または安全のための指示や監視が必要。 |
| | 5 | 移乗の介助 | 自力で臥位から起きあがって腰かけられるが、移乗に介助が必要。 |
| | 0 | 全介助・不能 | |
| 3. 整容 | 5 | 自立 | 手と顔を洗う。整髪する。歯を磨く。髭を剃る（道具は何でもよいが、引出しからの収納も含めて道具の操作・管理が介助なしにできる）。女性は化粧も含む（ただし髪を編んだり髪型を整えることは除く）。 |
| | 0 | 全介助・不能 | |
| 4. トイレ動作 | 10 | 自立 | トイレの出入り（腰かけ、離れを含む）、ボタンやファスナーの着脱と汚れないための準備、トイレットペーパーの使用、手すりの使用は可。トイレの代わりに差し込み便器を使用する場合は便器の清浄管理ができる。 |
| | 5 | 部分介助 | バランス不安定、衣服操作・トイレットペーパーの使用に介助が必要。 |
| | 0 | 全介助・不能 | |
| 5. 入浴 | 5 | 自立 | 浴槽に入る、シャワーを使う、スポンジで洗う、このすべてがどんな方法でもよいが |
| | 0 | 全介助・不能 | |

| | | | |
|----------|----|--------|---|
| 6. 移動 | 15 | 自立 | 介助や監視なしに 45m 以上歩ける。義肢・装具や杖・歩行器（車つきを除く）を使用してよい。装具使用の場合には立位や坐位でロック操作が可能なこと。装着と取り外しが可能なこと。 |
| | 10 | 部分介助 | 上記事項について、わずかな介助や監視があれば 45m 以上歩ける。 |
| | 5 | 車椅子使用 | 歩くことはできないが、自力で車椅子の操作ができる。角を曲がる、方向転換、テーブル、ベッド、トイレ等への操作など、45m 以上移動できる。患者が歩行可能なときは採点しない。 |
| | 0 | 全介助・不能 | |
| 7. 階段昇降 | 10 | 自立 | 介助または監視なしに安全に階段の昇降ができる。手すり、杖、クラッチの使用可。杖を持ったままの昇降も可能。 |
| | 5 | 部分介助 | 上記事項について、介助や監視が必要。 |
| | 0 | 全介助・不能 | |
| 8. 更衣 | 10 | 自立 | 通常着けている衣服、靴、装具の脱着（こまかい着かたまでは必要条件としない；実用性があればよい）が行える。 |
| | 5 | 部分介助 | 上記事項について、介助を要するが、作業の半分以上は自分で行え、妥当な時間内に終了する。 |
| | 0 | 全介助・不能 | |
| 9. 排便自制 | 10 | 自立 | 排便の自制が可能で失敗がない。座薬や浣腸の使用を含む。 |
| | 5 | 部分介助 | 座薬や浣腸の使用に介助を要したり、ときどき失敗する。 |
| | 0 | 全介助・不能 | |
| 10. 排尿自制 | 10 | 自立 | 昼夜とも排尿自制可能。 |
| | 5 | 部分介助 | ときどき失敗がある。トイレに行くことや尿器の準備が間に合わなかったり、集尿バッグの操作に介助が必要。 |
| | 0 | 全介助・不能 | |

合計 点

③ 〈modified Rankin Scale〉

| |
|---|
| <input type="checkbox"/> 0. 全く障害なし |
| <input type="checkbox"/> 1. 症状はあるが特に問題となる障害はない。日常生活および活動は可能 |
| <input type="checkbox"/> 2. 軽度の障害。以前の活動は障害されているが、介助なしに自分のことができる |
| <input type="checkbox"/> 3. 中程度の障害。何らかの介助を要するが、介助なしに歩行可能 |
| <input type="checkbox"/> 4. 比較的高度の障害。歩行や日常生活に介助が必要 |
| <input type="checkbox"/> 5. 高度の障害。ベッド上の生活、失禁、常に介助が必要 |
| <input type="checkbox"/> 6. 死亡 |

④ (NIHSS)

| | |
|---|---|
| 1a. 意識水準 | <input type="checkbox"/> 0: 完全覚醒 <input type="checkbox"/> 1: 簡単な刺激で覚醒 <input type="checkbox"/> 2: 繰り返し刺激、強い刺激で覚醒 <input type="checkbox"/> 3: 完全に無反応 |
| 1b. 意識障害-質問 (今月の月名及び年齢) | <input type="checkbox"/> 0: 両方正解 <input type="checkbox"/> 1: 片方正解 <input type="checkbox"/> 2: 両方不正解 |
| 1c. 意識障害-従命 (開閉眼、「手を握る・開く」) | <input type="checkbox"/> 0: 両方可 <input type="checkbox"/> 1: 片方可 <input type="checkbox"/> 2: 両方不可 |
| 2. 最良の注視 | <input type="checkbox"/> 0: 正常 <input type="checkbox"/> 1: 部分的注視麻痺 <input type="checkbox"/> 2: 完全注視麻痺 |
| 3. 視野 | <input type="checkbox"/> 0: 視野欠損なし <input type="checkbox"/> 1: 部分的半盲 <input type="checkbox"/> 2: 完全半盲 <input type="checkbox"/> 3: 両側性半盲 |
| 4. 顔面麻痺 | <input type="checkbox"/> 0: 正常 <input type="checkbox"/> 1: 軽度の麻痺 <input type="checkbox"/> 2: 部分的麻痺 <input type="checkbox"/> 3: 完全麻痺 |
| 5. 上肢の運動 (右) *仰臥位のときは45度右上肢 <input type="checkbox"/> 9: 切断、関節癒合 | <input type="checkbox"/> 0: 90度*を10秒間保持可能 (下垂なし) <input type="checkbox"/> 1: 90度*を保持できるが、10秒以内に下垂 <input type="checkbox"/> 2: 90度*の挙上または保持ができない <input type="checkbox"/> 3: 重力に抗して動かない <input type="checkbox"/> 4: 全く動きが見られない |
| 上肢の運動 (左) *仰臥位のときは45度左上肢 <input type="checkbox"/> 9: 切断、関節癒合 | <input type="checkbox"/> 0: 90度*を10秒間保持可能 (下垂なし) <input type="checkbox"/> 1: 90度*を保持できるが、10秒以内に下垂 <input type="checkbox"/> 2: 90度*の挙上または保持ができない <input type="checkbox"/> 3: 重力に抗して動かない <input type="checkbox"/> 4: 全く動きが見られない |
| 6. 下肢の運動 (右) *仰臥位のときは45度右上肢 <input type="checkbox"/> 9: 切断、関節癒合 | <input type="checkbox"/> 0: 30度*を5秒間保持可能 (下垂なし) <input type="checkbox"/> 1: 30度*を保持できるが、5秒以内に下垂 <input type="checkbox"/> 2: 重力に抗して動きが見られる <input type="checkbox"/> 3: 重力に抗して動かない <input type="checkbox"/> 4: 全く動きが見られない |
| 下肢の運動 (左) *仰臥位のときは45度左上肢 <input type="checkbox"/> 9: 切断、関節癒合 | <input type="checkbox"/> 0: 30度*を5秒間保持可能 (下垂なし) <input type="checkbox"/> 1: 30度*を保持できるが、5秒以内に下垂 <input type="checkbox"/> 2: 重力に抗して動きが見られる <input type="checkbox"/> 3: 重力に抗して動かない <input type="checkbox"/> 4: 全く動きが見られない |
| 7. 運動失調 <input type="checkbox"/> 9: 切断、関節癒合 | <input type="checkbox"/> 0: なし <input type="checkbox"/> 1: 1肢 <input type="checkbox"/> 2: 2肢 |
| 8. 感覚 | <input type="checkbox"/> 0: 障害なし <input type="checkbox"/> 1: 軽度から中等度 <input type="checkbox"/> 2: 重度 |
| 9. 最良の言語 | <input type="checkbox"/> 0: 失語なし <input type="checkbox"/> 1: 軽度から中等度 <input type="checkbox"/> 2: 重度の失語 <input type="checkbox"/> 3: 無言、全失語 |
| 10. 構音障害 <input type="checkbox"/> 9: 挿管または身体的障壁 | <input type="checkbox"/> 0: 正常 <input type="checkbox"/> 1: 軽度から中等度 <input type="checkbox"/> 2: 重度 |
| 11. 消去現象と注意障害 | <input type="checkbox"/> 0: 異常なし <input type="checkbox"/> 1: 視覚、触覚、聴覚、視空間、または自己身体に対する不注意、 あるいは1つの感覚様式で2点同時刺激に対する消去現象 <input type="checkbox"/> 2: 重度の半側不注意あるいは2つ以上の感覚様式に対する半側不注意 |

⑤ 〈MMSE〉

| | 質問内容 | 回答 | 得点 |
|---------|--|------|----|
| 1 (5点) | 今日は何年ですか。 今の季節は何ですか。 今日は何曜日ですか。 今日は何月何日ですか。 | 年 | |
| | | | |
| | | 曜日 | |
| | | 月 | |
| | | 日 | |
| 2 (5点) | ここはなに県ですか。 ここはなに市ですか。 ここはなに病院ですか。 ここは何階ですか。 ここはなに地方ですか。(例：関東地方) | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| 3 (3点) | 物品名3個(例：りんご、電車、着物) 検者は物の名前を1秒間に1個ずつ言う。その後、被験者に繰り返させる。 正答1個につき1点を与える。3個すべて言うまで繰り返す。(6回まで) 繰り返した回数____回 | | |
| 4 (5点) | 100から順に7を引く(5回まで)。 | | |
| 5 (3点) | 3で提示した物品名を再度復唱させる。 | | |
| 6 (2点) | (時計を見せながら)これは何ですか。 (鉛筆を見せながら)これは何ですか。 | | |
| 7 (1点) | 次の文章を繰り返す・ 「みんなで、力を合わせて綱を引きます」 | | |
| 8 (3点) | (3段階の命令) 「右手にこの紙を持ってください」 「それを半分に折りたたんでください」 「机の上に置いてください」 | | |
| 9 (1点) | (次の文章を読んで、その指示に従ってください) 「眼を閉じてください」 | | |
| 10 (1点) | (なにか文章を書いてください) | | |
| 11 (1点) | (次の図形を書いてください) | | |
| | | 得点合計 | |

⑥ (Clinical Dementia Rating)

| | 健康 (CDR 0) | 痴呆の疑い (CDR 0.5) | 軽度痴呆 (CDR 1) | 中等度痴呆 (CDR 2) | 重度痴呆 (CDR 3) |
|--------------|--|--|---|---|--|
| 記憶 | <input type="checkbox"/> 記憶障害なし。時に若干もの忘れ | <input type="checkbox"/> 一貫した軽いもの忘れ。出来事を部分的に思い出す良性健忘 | <input type="checkbox"/> 中等度記憶障害、とくに最近の出来事に関するもの日常活動に支障 | <input type="checkbox"/> 重度記憶障害。高度に学習した記憶は保持、新しいものはすぐに忘れる | <input type="checkbox"/> 重度記憶障害。断片的記憶のみ残存 |
| 見当識 | <input type="checkbox"/> 見当識障害なし | 同左 | <input type="checkbox"/> 時間に対する障害あり。検査では場所、人物の失見当なし。しかし時に地理的失見当あり | <input type="checkbox"/> 常時、時間の失見当、時に場所の失見当 | <input type="checkbox"/> 人物への失見当識もあり |
| 判断力と問題解決 | <input type="checkbox"/> 適切な判断力、問題解決 | <input type="checkbox"/> 問題解決の障害が疑われる | <input type="checkbox"/> 複雑な問題解決に関する中程度の障害。社会的判断力は保持 | <input type="checkbox"/> 重度の問題解決能力の障害。社会的判断力の障害 | <input type="checkbox"/> 判断不能。問題解決不能 |
| 社会適応 | <input type="checkbox"/> 仕事、買い物、ビジネス、金銭の取り扱い、ボランティアや社会的グループで、普通の自立した機能 | <input type="checkbox"/> 左記の活動の軽度の障害もしくははその疑い | <input type="checkbox"/> 左記の活動のいくつかにかかわっていても、自立した機能が果たせない | <input type="checkbox"/> 家庭外(一般社会)では独立した機能は果たせない | 同左 |
| 家庭状況および趣味、関心 | <input type="checkbox"/> 家での生活趣味、知的関心が保持されている | <input type="checkbox"/> 同左、もしくはは若干の障害 | <input type="checkbox"/> 軽度の家庭生活の障害。複雑な家事は障害。高度の趣味・関心の喪失 | <input type="checkbox"/> 単純な家事のみ限定された関心 | <input type="checkbox"/> 家庭内不適応 |
| 介護状況 | <input type="checkbox"/> セルフケア安全 | 同左 | <input type="checkbox"/> ときどき注意が必要 | <input type="checkbox"/> 着衣、衛生管理など身の回りのことに介助が必要 | <input type="checkbox"/> 日常生活に十分な介護を要する。しばしば失禁 |

⑦DSM-III-R

| | |
|--------------------------|----------------------------------|
| <input type="checkbox"/> | A. 記憶（短期、長期）の障害 |
| <input type="checkbox"/> | B. 次のうち少なくとも1項目以上 |
| <input type="checkbox"/> | (1) 抽象的思考の障害 |
| <input type="checkbox"/> | (2) 判断の障害 |
| <input type="checkbox"/> | (3) 高次皮質機能の障害（失語、失行、失認、構成障害） |
| <input type="checkbox"/> | (4) 性格変化 |
| <input type="checkbox"/> | C. A, Bの障害により、仕事、社会活動、人間関係が損なわれる |
| <input type="checkbox"/> | D. 意識障害のときには判断しない（せん妄の除外） |
| <input type="checkbox"/> | E. 病歴や検査から脳器質性因子の存在が推測できる |

（上記A～E全てを満たしたとき痴呆有りと診断する）

判定：痴呆症 有、なし

<糖尿病患者におけるサブ解析>

<糖尿病病型分類>

I型糖尿病、II型糖尿病、その他：_____

<眼底所見> 最新の検査結果（CD34 陽性細胞測定より1年未満の検査）

福田分類 _____

<腎機能>

血中クレアチニン濃度 : _____ mg/dl

血中BUN濃度 : _____ mg/dl

<介護保険利用患者におけるサブ解析>

記入日 平成 年 月 日 (CD34 陽性細胞測定より 6 ヶ月以内)

診断名 1 : _____ 診断名 2 : _____ 診断名 3 : _____

<日常生活の自立度>

- ・ 障害老人の日常生活自立度 (寝たきり度) 正常 J1 J2 A1 A2 B1 B2 C1 C2
- ・ 痴呆性老人の日常生活自立度 正常 I IIa IIb IIIa IIIb IV M

<理解及び記憶>

- ・ 短期記憶 問題なし 問題あり
- ・ 日常の意志決定を行うための認知能力 自立 いくらか困難 見守り必要 判断できない
- ・ 自分の意志の伝達能力 伝えられる いくらか困難 具体的要求に限られる 伝えられない
- ・ 食事 自立ないし何とか自分で食べられる 全面介助

<問題行動の有無> 有 無

- 有の場合・・・幻想・幻聴 妄想 昼夜逆転 暴言 暴行 介護への抵抗 徘徊 火の不始末
 不潔行為 異食行動 性的問題行動 その他 ()

<医学的管理の必要性>

- | | | |
|-------------|----------|----------------------|
| 訪問診療 | 短期入所療養介護 | 訪問栄養食事指導 |
| 訪問看護 | 訪問歯科診療 | その他 () |
| 訪問リハビリテーション | 訪問歯科衛生指導 | |
| 通所リハビリテーション | 訪問薬剤管理指導 | |

過去の記録 (CD34 陽性細胞測定より 7 ヶ月以降 18 ヶ月以内)

記入日 平成 年 月 日 (CD34 陽性細胞測定より 6 ヶ月以内)

診断名 1 : _____ 診断名 2 : _____ 診断名 3 : _____

<日常生活の自立度>

- ・ 障害老人の日常生活自立度 (寝たきり度) 正常 J1 J2 A1 A2 B1 B2 C1 C2
- ・ 痴呆性老人の日常生活自立度 正常 I IIa IIb IIIa IIIb IV M

<理解及び記憶>

- ・ 短期記憶 問題なし 問題あり
- ・ 日常の意志決定を行うための認知能力 自立 いくらか困難 見守り必要 判断できない
- ・ 自分の意志の伝達能力 伝えられる いくらか困難 具体的要求に限られる 伝えられない
- ・ 食事 自立ないし何とか自分で食べられる 全面介助

<問題行動の有無> 有 無

- 有の場合・・・幻想・幻聴 妄想 昼夜逆転 暴言 暴行 介護への抵抗 徘徊 火の不始末
 不潔行為 異食行動 性的問題行動 その他 ()

<医学的管理の必要性>

- | | | |
|-------------|----------|----------------------|
| 訪問診療 | 短期入所療養介護 | 訪問栄養食事指導 |
| 訪問看護 | 訪問歯科診療 | その他 () |
| 訪問リハビリテーション | 訪問歯科衛生指導 | |
| 通所リハビリテーション | 訪問薬剤管理指導 | |

過去の記録 (CD34 陽性細胞測定より 19 ヶ月以降 30 ヶ月以内)

記入日 平成 年 月 日 (CD34 陽性細胞測定より 6 ヶ月以内)

診断名 1 : _____ 診断名 2 : _____ 診断名 3 : _____

〈日常生活の自立度〉

- ・ 障害老人の日常生活自立度 (寝たきり度) 正常 J1 J2 A1 A2 B1 B2 C1 C2
- ・ 痴呆性老人の日常生活自立度 正常 I IIa IIb IIIa IIIb IV M

〈理解及び記憶〉

- ・ 短期記憶 問題なし 問題あり
- ・ 日常の意志決定を行うための認知能力 自立 いくらか困難 見守り必要 判断できない
- ・ 自分の意志の伝達能力 伝えられる いくらか困難 具体的要求に限られる 伝えられない
- ・ 食事 自立ないし何とか自分で食べられる 全面介助

〈問題行動の有無〉

| | | | | | | | | | |
|----------------------|------|--------|------------------------------|----|--------|----|-------|--|--|
| 有 | 無 | | | | | | | | |
| 有の場合・・・幻想・幻聴 不潔行為 | 妄想 | 昼夜逆転 | 暴言 | 暴行 | 介護への抵抗 | 徘徊 | 火の不始末 | | |
| | 異食行動 | 性的問題行動 | その他 () | | | | | | |

〈医学的管理の必要性〉

| | | |
|-------------|----------|------------------------------|
| 訪問診療 | 短期入所療養介護 | 訪問栄養食事指導 |
| 訪問看護 | 訪問歯科診療 | その他 () |
| 訪問リハビリテーション | 訪問歯科衛生指導 | |
| 通所リハビリテーション | 訪問薬剤管理指導 | |

過去の記録 (CD34 陽性細胞測定より 31 ヶ月以降 42 ヶ月以内)

記入日 平成 年 月 日 (CD34 陽性細胞測定より 6 ヶ月以内)

診断名 1 : _____ 診断名 2 : _____ 診断名 3 : _____

〈日常生活の自立度〉

- ・ 障害老人の日常生活自立度 (寝たきり度) 正常 J1 J2 A1 A2 B1 B2 C1 C2
- ・ 痴呆性老人の日常生活自立度 正常 I IIa IIb IIIa IIIb IV M

〈理解及び記憶〉

- ・ 短期記憶 問題なし 問題あり
- ・ 日常の意志決定を行うための認知能力 自立 いくらか困難 見守り必要 判断できない
- ・ 自分の意志の伝達能力 伝えられる いくらか困難 具体的要求に限られる 伝えられない
- ・ 食事 自立ないし何とか自分で食べられる 全面介助

〈問題行動の有無〉

| | | | | | | | | | |
|----------------------|------|--------|------------------------------|----|--------|----|-------|--|--|
| 有 | 無 | | | | | | | | |
| 有の場合・・・幻想・幻聴 不潔行為 | 妄想 | 昼夜逆転 | 暴言 | 暴行 | 介護への抵抗 | 徘徊 | 火の不始末 | | |
| | 異食行動 | 性的問題行動 | その他 () | | | | | | |

〈医学的管理の必要性〉

| | | |
|-------------|----------|------------------------------|
| 訪問診療 | 短期入所療養介護 | 訪問栄養食事指導 |
| 訪問看護 | 訪問歯科診療 | その他 () |
| 訪問リハビリテーション | 訪問歯科衛生指導 | |
| 通所リハビリテーション | 訪問薬剤管理指導 | |

〈脳梗塞による入院歴のある患者におけるサブ解析〉

退院年月日
昭和、平成 年 月 日

入院時

Barthel Index :
NIHSS :
modified Rankin Scale :

退院時

Barthel Index :
NIHSS :
modified Rankin Scale :
MMSE :

Circulating CD34-Positive Cells Provide an Index of Cerebrovascular Function

Akihiko Taguchi, MD; Tomohiro Matsuyama, MD; Hiroshi Moriwaki, MD; Takuya Hayashi, MD; Kohei Hayashida, MD; Kazuyuki Nagatsuka, MD; Kenichi Todo, MD; Katsushi Mori; David M. Stern, MD; Toshihiro Soma, MD; Hiroaki Naritomi, MD

Background—Increasing evidence points to a role for circulating endothelial progenitor cells, including populations of CD34- and CD133-positive cells present in peripheral blood, in maintenance of the vasculature and neovascularization. Immature populations, including CD34-positive cells, have been shown to contribute to vascular homeostasis, not only as a pool of endothelial progenitor cells but also as a source of growth/angiogenesis factors at ischemic loci. We hypothesized that diminished numbers of circulating immature cells might impair such physiological and reparative processes, potentially contributing to cerebrovascular dysfunction.

Methods and Results—The level of circulating immature cells, CD34-, CD133-, CD117-, and CD135-positive cells, in patients with a history of atherothrombotic cerebral ischemic events was analyzed to assess possible correlations with the degree of carotid atherosclerosis and number of cerebral infarctions. There was a strong inverse correlation between numbers of circulating CD34- and CD133-positive cells and cerebral infarction. In contrast, there was no correlation between the degree of atherosclerosis and populations of circulating immature cells. Analysis of patients with cerebral artery occlusion revealed a significant positive correlation between circulating CD34- and CD133-positive cells and regional blood flow in areas of chronic hypoperfusion.

Conclusions—These results suggest a possible contribution of circulating CD34- and CD133-positive cells in maintenance of the cerebral circulation in settings of ischemic stress. Our data demonstrate the utility of a simple and precise method to quantify circulating CD34-positive cells, the latter providing a marker of cerebrovascular function. (*Circulation*. 2004;109:2972-2975.)

Key Words: cerebral infarction ■ cerebral ischemia ■ antigens, CD34 ■ stem cells

Although it had traditionally been assumed that replacement of damaged endothelium resulted only from outgrowth of preexisting vasculature, recent studies have identified endothelial progenitor cells (EPCs) that appear to contribute to vascular homeostasis and repair.¹ Clinical trials to assess the therapeutic potential of bone marrow–derived mononuclear cells, a rich source of immature cells including EPCs, in hind-limb^{2,3} and cardiac ischemia⁴ have been initiated and have, thus far, provided promising results. Furthermore, immature cells, including CD34-positive (CD34⁺) cells, have been shown to contribute to maintenance of the vasculature, not only as a pool of EPCs but also as the source of growth/angiogenesis factors.⁵ Bone marrow–derived immature cells have also been shown to participate in neovascularization of ischemic brain after experimental stroke.⁶ On the basis of these results, we hypothesized that levels of circulating immature cells might be proportional to

the resilience of the cerebral circulation to ischemic stress; ie, lower numbers of circulating immature cells might be associated with cerebral ischemia and infarction.

Methods

The institutional review board of the National Cardiovascular Center approved this study. All subjects provided informed consent. Circulating CD34⁺ cells in 50 μ L of peripheral blood were quantified according to the manufacturer's protocol (ProCOUNT, Becton Dickinson Biosciences). To minimize intersample variation for measurements of CD34⁺ cells, several methods were used: A nucleic acid dye was added as a threshold reagent; a no-wash technique was performed to eliminate cell loss, and reverse pipetting was used; an internal reference particle was added for determination of absolute cell numbers; and an isotype control, matched for the concentration of anti-CD34 antibody and fluorochrome-to-protein ratio, was included. All measurements were performed in triplicate (Figure 1A, control; Figure 1B, CD34). To quantify other stem cell populations (besides CD34⁺ cells), immature mononuclear cells were enriched

Received December 8, 2003; de novo received April 12, 2004; accepted May 11, 2004.

From the Departments of Cerebrovascular Disease (A.T., H.M., K.N., K.T., H.N.), Radiology and Nuclear Medicine (T.H., K.H.), and Clinical Physiology (K.M.), National Cardiovascular Center, Osaka, Japan; Department of Internal Medicine (T.M.), Hyogo College of Medicine, Hyogo, Japan; Dean's Office (D.M.S.), Medical College of Georgia, Augusta, Ga; and Department of Hematology (T.S.), Osaka Minami National Hospital, Osaka, Japan.

Correspondence to Akihiko Taguchi, Department of Cerebrovascular Disease, National Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka, 565-8565 Japan. E-mail ataguchi@res.ncvc.go.jp

© 2004 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at <http://www.circulationaha.org>

DOI: 10.1161/01.CIR.0000133311.25587.DE

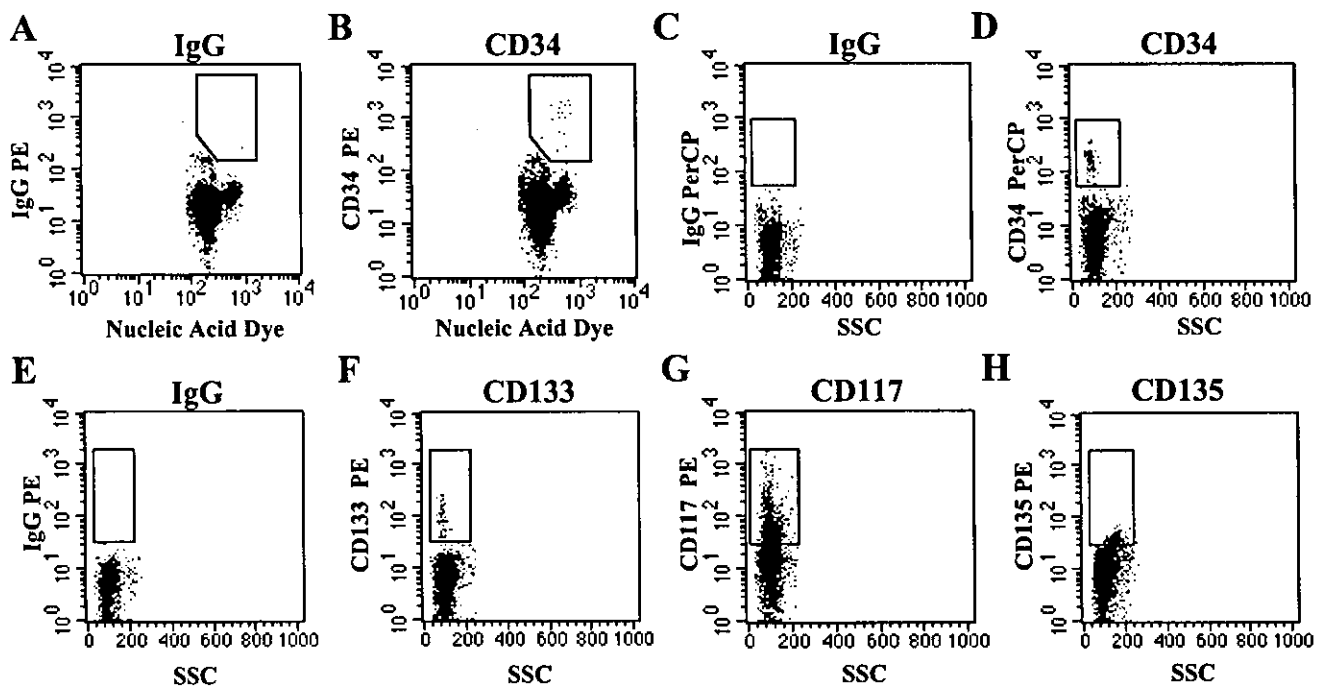


Figure 1. Quantification of circulating immature cells in patients with stroke. Nucleic acid dye versus CD34 PE dot plot was gated on lymphocytes and CD45 dim leukocytes. A, Results with an isotype-matched control antibody. B, Results with anti-CD34 antibody. Enriched immature mononuclear cells were double-stained with PerCP-conjugated CD34 antibody (D) and PE-conjugated CD133 (F), CD117 (G), or CD135 (H) antibody. The number of cells in a region including brightly stained cells was counted. C and E, Staining with isotype nonimmune control antibody.

from 2 mL of peripheral blood by antibody-mediated depletion of mature cells according to the manufacturer's protocol (StemCell Technologies) using depletion cocktail, including antibodies to CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, and CD66b. Enriched immature mononuclear cells were double-stained with peridinin chlorophyll protein (PerCP)-conjugated CD34 antibody (Figure 1D) and phycoerythrin (PE)-conjugated CD133 (Figure 1F), CD117 (Figure 1G), or CD135 (Figure 1H) antibody. The number of cells in a region including brightly stained cells was counted, and immature cells were quantified using CD34⁺ cells as an internal control. The cumulative intra-assay coefficient of variation was 14%, 13%, 14%, and 15%, with CD34⁺, CD133⁺, CD117⁺, and CD135⁺ cell measurements, respectively, from 5 stroke patients.

Atherosclerosis in the common and internal carotid arteries was analyzed by ultrasonography to determine plaque score as described previously.⁷ Cerebral infarcts (diameter >5 mm) were counted independently by a neurologist blinded to other parameters under study (number of circulating CD34⁺, etc) using T1-weighted, T2-weighted, and fluid-attenuated inversion-recovery MRI obtained with a 1.5-Tesla MRI scanner. The diagnosis of hypoperfusion was made angiographically. Regional cerebral blood flow (CBF), cerebral blood volume, oxygen extraction fraction (OEF), and cerebral metabolic rate of oxygen (CMRO₂) were quantified by conventional steady-state ¹⁵O PET using a PET scanner (Shimadzu) as described.⁸ Cerebrovascular function was evaluated in patients with chronic hypoperfusion caused by major cerebral artery (carotid artery or M1 portion of the middle cerebral artery) occlusion or severe stenoses (>90%) without a major stroke. Twelve patients with 15 major arterial occlusions or stenoses had PET examinations.

To investigate the mobilization of immature cells after acute cerebral infarction, peripheral blood was quantified at 6 hours and 3, 7, 14, and 30 days after the onset of stroke. The episodes of acute cerebral infarction were confirmed by the diffusion image of brain MRI. Age-matched volunteers who had no history of cerebrovascular diseases and no neuronal deficiency were enrolled as controls (mean age, 67±4 years). Test-retest intraclass correlations were 0.88, 0.75, 0.86, and 0.86 for CD34, CD133, CD117, and CD135,

respectively, obtained from 5 volunteers tested twice with an interval of at least 10 days between samples.

Univariate correlations were performed using Pearson's correlation coefficient and Spearman's correlation coefficient. Statistical comparisons among groups were determined using analysis of variance. Individual comparisons were performed using Student's *t* test. In all experiments, mean±SE is reported.

Results

First, we investigated mobilization of immature cells after acute cerebral infarction (n=5), focusing on CD34⁺ cells. The level of CD34⁺ cells gradually increased to day 7 and remained significantly above the prestroke baseline on days 7 and 14, returning to baseline levels by day 30 (Figure 2A). On the basis of these data, we enrolled 25 patients with a history of atherothrombotic cerebral ischemic events, excluding those who had suffered cerebrovascular or cardiovascular acute ischemic episodes in the 30 days before study, as well as premenopausal females. In this group (>30 days after stroke), no correlation was observed between the interval after stroke and the level of circulating CD34⁺ cells (*r*=0.009, *P*=0.97). Characteristics of this group included mean age of 68±2 years, 20 men and 5 women, 23 patients receiving antiplatelet therapy, 11 patients receiving antihypertensive therapy, 6 patients receiving therapy for hyperlipidemia, 5 patients receiving therapy for diabetes mellitus (DM), and 16 patients with a current or past history of smoking.

Several factors were found to influence the number of circulating CD34⁺ cells. Statistical analysis revealed a significant decrease in circulating CD34⁺ cells in patients with DM (0.5±0.1; non-DM, 1.2±0.1 cells/μL; *P*=0.01). In contrast,

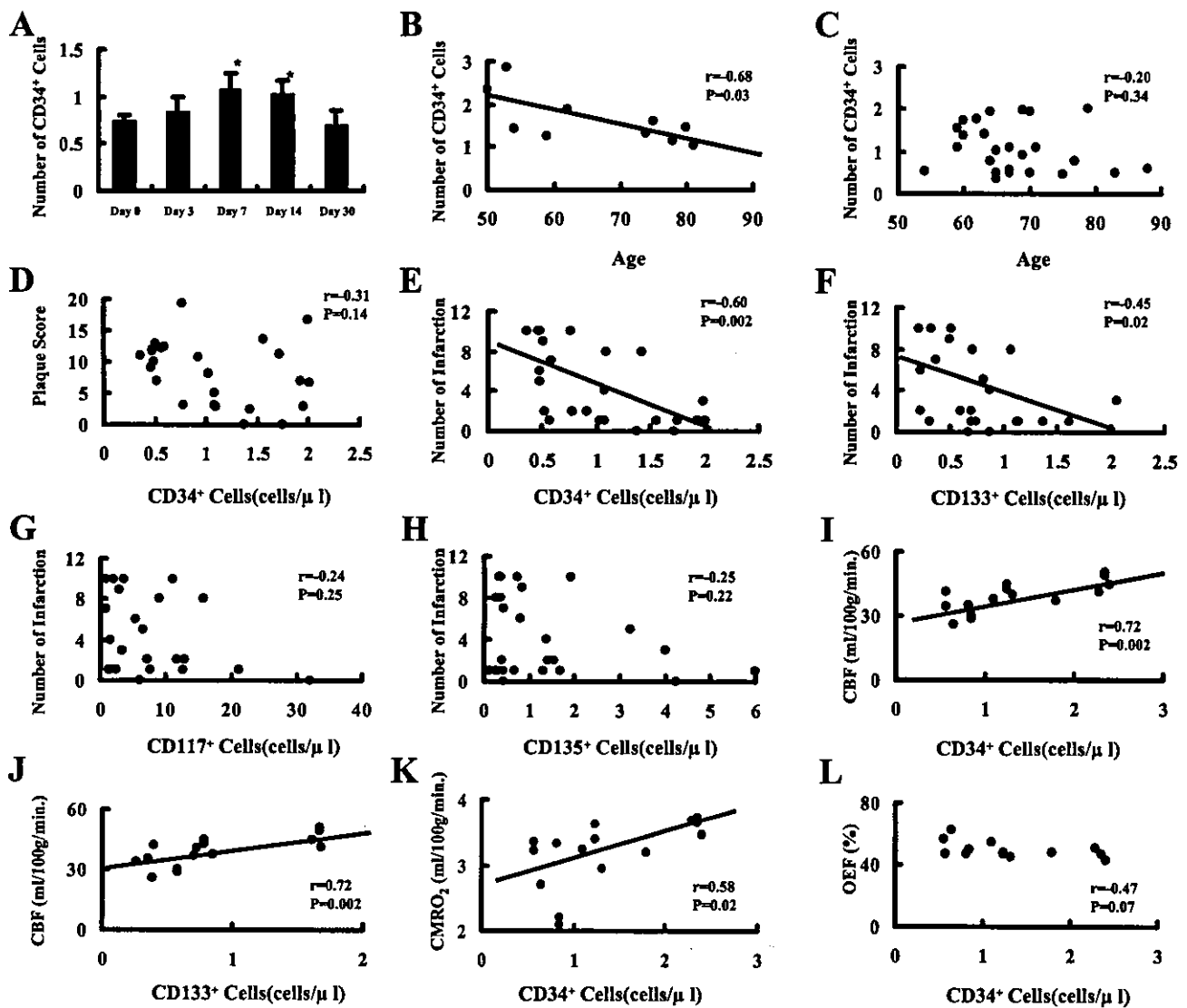


Figure 2. Levels of circulating CD34⁺ cells and stroke. Circulating CD34⁺ cells increased after the onset of stroke and peaked on day 7. A significant increase in circulating CD34⁺ cells was observed on days 7 and 14 (A). A decrease of circulating CD34⁺ cell was observed with aging in the control group (B), but no such correlation was observed in the stroke patient group (C). No correlation was observed between the number of circulating CD34⁺ cells and the degree of arteriosclerosis in major cerebral arteries (D). However, there was a correlation between cerebral infarctions and circulating CD34⁺ (E) and CD133⁺ cells (F). In contrast, there was no correlation between cerebral infarction and CD117⁺ (G) or CD135⁺ cells (H). Correlation between circulating CD34⁺ (I) and CD133⁺ (J) cells and CBF in areas of chronic hypoperfusion was observed. Lower levels of circulating CD34⁺ cells were correlated with a decrease in CMRO₂ (K) but not with a change in OEF (L). **P*<0.05 compared with day 0 (based on 2-way ANOVA).

no change was observed in patients with hypertension (*P*=0.61), with hyperlipidemia (*P*=0.81), with smoking (*P*=0.64), or based on gender (*P*=0.36). In addition, treatment with HMG-CoA reductase inhibitors (*P*=0.81), compared with patients without hyperlipidemia, did not impact the number of CD34⁺ cells. In the control patient group, a decrease of circulating CD34⁺ cells was observed with aging (Figure 2B), although this was not observed in the patient group (Figure 2C). Comparing baseline levels of circulating CD34⁺ cells, there was a significant decrease in the patient group compared with age-matched controls (stroke, 1.1±0.1; control, 1.6±0.2 cells/μL; *P*=0.02).

We sought a possible correlation between circulating immature cells and the degree of arteriosclerosis of the common and

internal carotid arteries in the patients with atherothrombotic cerebral ischemic events. However, there was no significant correlation between arteriosclerosis and circulating CD34⁺ (Figure 2D). This result was not surprising, because multiple risk factors and cell types contribute to progression of vascular lesions in major arteries. In contrast, because disruption of vascular homeostasis and repair are associated with cerebral infarction, we reasoned that a history of cerebral infarction might correlate with circulating immature cells. A strong correlation was observed between the number of infarcts and the absolute number of circulating CD34⁺ cells (Figure 2E) and CD133⁺ cells (Figure 2F). However, no significant correlation with regard to cerebral infarcts was observed with circulating CD117⁺ cells (Figure 2G) and CD135⁺ cells (Figure 2H).

In view of the critical role of endothelium in maintaining CBF, we evaluated cerebrovascular function in patients with chronic hypoperfusion. Direct correlations were observed between CBF (in the chronically hypoperfused area) and circulating CD34⁺ cells (Figure 2I) and CD133⁺ cells (Figure 2J). In addition, lower numbers of circulating CD34⁺ cells (Figure 2K) correlated with diminished CMRO₂, although there was no significant increase in the OEF (Figure 2L). These observations suggest a contribution of CD34⁺ cells in homeostasis and repair of the cerebral circulation and maintenance of brain metabolism. No correlation was observed with the above parameters of vascular function and circulating CD117⁺ and CD135⁺ cells. Measurement of angiogenic growth factors in patient plasma, vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, hemopoietic growth factor, and insulin-like growth factor-I also demonstrated no correlation with indices of cerebrovascular function or the number of CD34⁺ cells (not shown).

Discussion

We have found that circulating immature cell populations, especially CD34⁺ and CD133⁺ cells, are associated with maintenance and repair of the cerebral vasculature. In our study, we used a simple and precise method to count the absolute number of circulating CD34⁺ cells in a small sample of peripheral blood. Our results indicate that the level of CD34⁺ cells serves as an index/marker for cerebrovascular function. Analysis of CD133⁺, CD117⁺, and CD135⁺ cells, which identify other populations of immature cells, demonstrated that only CD133⁺ cells correlated with cerebrovascular function in a manner paralleling CD34⁺ cells.

Patients with diabetes displayed a significant reduction in the number of circulating CD34⁺ cells. In view of the microvascular dysfunction that is characteristic of diabetes, this may not be surprising. Similarly, decreased circulating CD34⁺ cells with increasing age in healthy individuals may be associated with limited vascular renewal in older individuals. It was also of interest to note no change between levels of CD34⁺ cells in patients taking HMG-CoA reductase inhibitors. The latter results might reflect the positive effect

of such drugs countering the negative effect of hyperlipidemia on circulating CD34⁺ cells. Such conclusions, of course, are at best tentative, because in this first report we have identified associations rather than proved a cause-effect relationship.

These observations suggest that diminished numbers of CD34⁺ and CD133⁺ cells impact maintenance and repair of cerebral vasculature. Precise measurement of circulating CD34⁺ cells provides a marker for cerebrovascular function in the setting of ischemic stress.

Acknowledgments

This work was supported by the Uehara, Takeda, Terumo Medical Foundations and KAKENHI (15590785). The sponsors of the study had no role in study design, data collection, data analysis, interpretation, or writing of the report.

References

1. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964–967.
2. 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*. 2003;25:276–278.
3. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;360:427–435.
4. Hamano K, Nishida M, Hirata K, et al. Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results. *Jpn Circ J*. 2001;65:845–847.
5. Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, et al. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34⁺ cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood*. 2001;97:3075–3085.
6. Beck H, Voswinckel R, Wagner S, et al. Participation of bone marrow-derived cells in long-term repair processes after experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23:709–717.
7. Sasaki T, Watanabe M, Nagai Y, et al. Association of plasma homocysteine concentration with atherosclerotic carotid plaques and lacunar infarction. *Stroke*. 2002;33:1493–1496.
8. 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*. 1994;14:763–770.