

3. 血漿 BNP 濃度と%FS は負の相関、LV mass index、E/A は正の相関を認めた。
末梢血 CD34 陽性細胞数と LV mass index は負の相関を認めた。

以上の事より高齢 2 型糖尿病患者において、末梢血中の血管内皮前駆細胞数が左心機能障害に関連する可能性が示唆されるとともに、心臓超音波所見からは、末梢血 CD34 陽性細胞数と血漿 BNP 濃度の相関関係には、左室肥大の関与が疑われた。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

岡田定規 他

2006. 03. 25

日本循環器病学会総会

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

末梢血血管内皮前駆細胞と糖尿病性腎症の進展

分担研究者

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
長束一行	国立循環器病センター	内科脳血管部門	医長

共同研究者

榎野 久士	国立循環器病センター	代謝内科	医員
吉政 康直	国立循環器病センター	代謝内科	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

糖尿病性腎症の初期に認められる尿中微量アルブミンは心血管病発症の危険因子であり、このことは心血管病と糖尿病性腎症のメカニズムに共通の因子があることを示唆している。近年、末梢血血管内皮前駆細胞（Endothelial progenitor cell:EPC）の減少が虚血性心疾患などの動脈硬化性疾患発症と関連していることが報告されているが、本研究においては、糖尿病患者における EPC と microangiopathy である糖尿病性腎症の関連を明らかにした。

A. 研究目的

本研究では糖尿病性腎症と末梢血 EPC の関連を明らかにすることを目的とし

て、断面的検討および前向き検討を行う。

B. 研究方法

腎症病期が早期腎症までの70歳以下の2型糖尿病患者85人について検討した。末梢血EPC測定として末梢血CD34陽性細胞をフローサイトメトリーにより測定し、尿アルブミン排泄量との関連や腎症病期との関連を横断的に検討した。更に低EPC血症が腎症進展に及ぼす影響を検討するため、CD34陽性細胞数の上位25% (CD34陽性細胞 1.0個/ml以上、高EPC群21名)と下位25% (CD34陽性細胞 0.68個/ml未満、低EPC群21名)について、6ヶ月後の尿アルブミン排泄について検討した。

C. 研究結果

末梢血CD34陽性細胞数はHbA1c、収縮期血圧、総コレステロール、尿アルブミン排泄の間には有意な相関関係を示さなかった。一方尿アルブミンの有無により、患者を2群に分けた解析では、CD34陽性細胞数は微量アルブミンを呈する早期腎症群において腎症前期群に比し有意に減少していた (0.68 ± 0.27 vs. 1.01 ± 0.55 個/ μ l, $p < 0.02$)。また高EPC群では6ヶ月後の尿アルブミン排泄は前値と差がなかったが ($13.1 \pm 4.0 \rightarrow 15.1 \pm 3.0$ mg/gCr)、低EPC群では6ヶ月後の尿アルブミン排泄が前値に比し有意に増加していた ($33.5 \pm 6.3 \rightarrow 67.0 \pm 22.1$ mg/gCr, $p < 0.05$)。

D. 考察および結論

早期腎症を有する患者では末梢血EPCの減少が存在し、低EPC血症が腎症進展に関与する可能性が示唆された。これらの結果は、末梢血EPCの補充や薬剤に

よる骨髄からの動員が、糖尿病性腎症の進展予防に役立つ可能性を示している
ものと、我々は考えている。

E. 健康危惧情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

投稿準備中

2. 学会発表

田口 明彦

2006. 03. 25

日本循環器病学会総会

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

分担研究課題名

CD34陽性細胞数と動脈硬化性因子の関連の検討

および血管内皮前駆細胞分画の解析

分担研究者

相馬俊裕 大阪南医療センター 臨床検査部 部長

岡本昌也 大阪南医療センター 脳内科 医長

福永隆三 星ヶ丘厚生年金病院 脳卒中内科 副院長

共同研究者

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

中枢神経疾患の病態と血管前駆細胞の関係を患者末梢血中の CD34 陽性細胞を測定することで予後因子との相関、及び CD34 陽性細胞値の性格を検討した。その結果年齢との相関、性差を見たほか、労作性狭心症の存在に関して強い負の相関が存在した。また最近血管前駆細胞として報告のある末梢血中の CD34 陽性 KDR 陽性細胞の測定を試みたが一部の欧米の報告に比し著しく低値を示し、また欧米の報告間にも報告数値に大きな差が見られ従来の測定法に問題があること

が示唆され、その解決策を提示した。

A. 研究目的

近年血管性疾患と思われる、脳梗塞、心筋梗塞、糖尿病性腎不全、リウマチ等において末梢血中の CD34 陽性細胞や血管前駆細胞と病態が相関している可能性が示唆されている。しかし CD34 陽性細胞や血管前駆細胞数の測定はその絶対数の少なさから正確な測定値を出すことが難しく、その再現性についても疑問視されている点も多い。本研究では厳密な測定方法を用いて、末梢血中血管血球系幹細胞と患者病態に関する検討を行った。

B. 研究方法

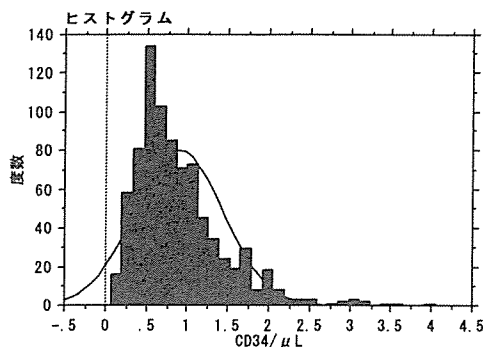
種々の循環器疾患患者末梢血中の CD34 陽性細胞を、我々の開発した高感度法で測定し統計解析を行った。また一部について CD34 陽性 KDR (VEGFR 2) 陽性細胞を測定するとともに、CD34 陽性細胞や CD34KDR 陽性細胞の測定値の特性を明らかにした

(倫理面への配慮) 採血の目的、解析などにつき 同意書を作成し文書による同意を得た。

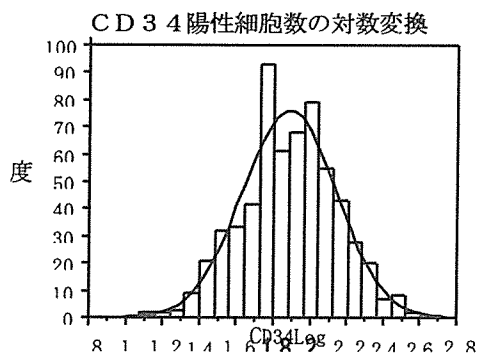
C. 研究結果

1 末梢血中 CD34 陽性細胞数の特徴

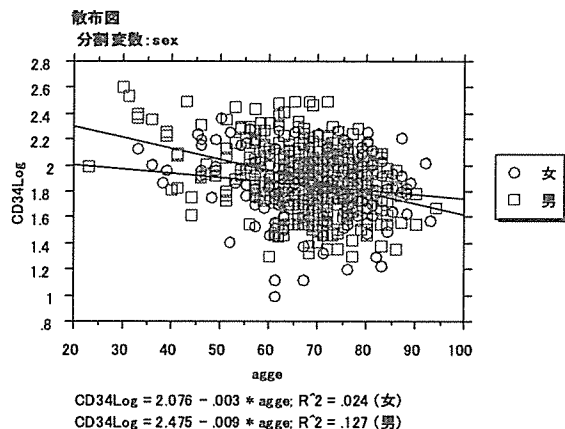
約 830 例の循環器疾患の末梢血単位あたりの CD34 陽性細胞数を測定した。その結果の分布は下図の様である。平均末梢血 1 μ L あたり 0.9 個で 0.1 個から 4.0 個まで観察された。



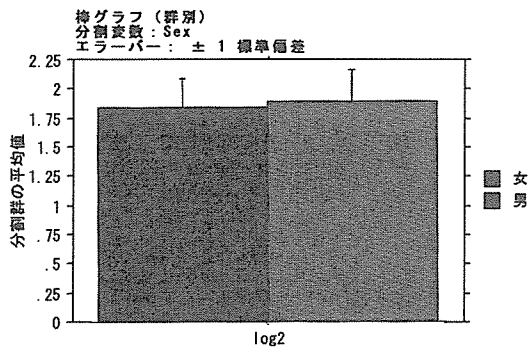
→



この結果は左図のように正規分布を示さないため種々の統計処理に用いる目的で対数変換した。結果は右図のようにきれいに正規化され、統計的にも正規性が確認された。対数変換した患者末梢血 CD34 陽性細胞と年齢、性に分けて検討したところ年齢と強い負の相関が見られ、また性差が明らかであった。(下図)



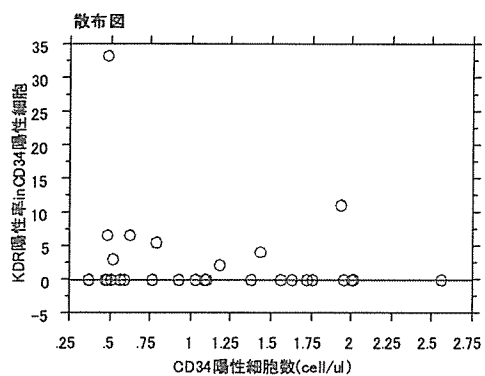
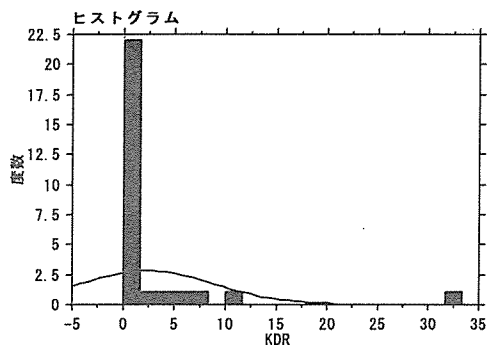
統計的有意差は年齢については $p < 0.0001$ と非常に強い有意差を有した(下図)。一方性差はそこまでの有意差はないが女性の方が低い値を示した。 $P = 0.0196$



そこで主に循環器疾患患者について基礎疾患と CD34 陽性細胞の相関を調べたところ、高脂血症、喫煙、高血圧、四肢動脈閉塞疾患、糖尿病、心筋梗塞とは有意の相関を示さなかったが、労作性狭心症とは相関が見られた。細胞数はごく軽微な差であるが $p < 0.0006$ とかなりの有意差水準である。

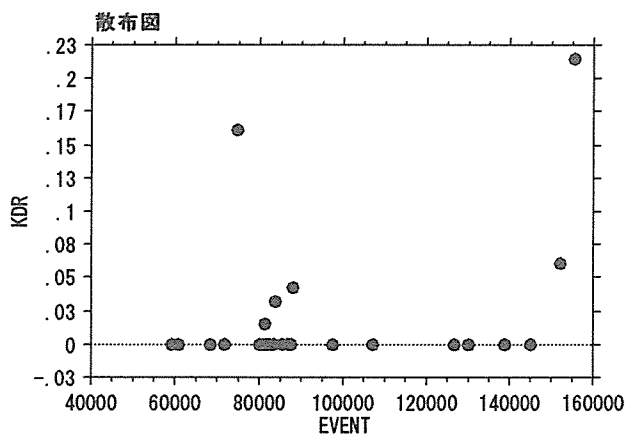
2 患者末梢血中の CD34 と KDR の 2 重陽性細胞測定 (以降 KDR と略す)

我々の測定した CD34 陽性、KDR 陽性細胞数は末梢血中の CD34 陽性細胞の 1-3% を示すにすぎなかった。また数値にかなりのばらつきがみえ、KDR についても対数変換が必要と考えられたが我々の測定では“0”が圧倒的に多いため変換は行わなかった。下図左に KDR 観測%を CD34 陽性細胞に対する%で表している。末梢血 $1 \mu\text{L}$ あたり平均 0.9 個の CD34 は 1ml 辺り 900 個に過ぎず、その 2% は 18 個となり異様に少ない細胞集団である。約 800 症例中最低 CD34 数を示した患者は $1 \mu\text{L}$ あたり 0.1 個であるからその場合は 100 個の CD34 に当たり、末梢血中の KDR は 1ml あたり平均 2 個となる。このレベルではバックグラウンドと区別がつかない。また測定値がとれた症例数は少ないが、我々の結果では CD34 陽性細胞数と KDR 数とは相関しなかった (下図右)。



3 KDRの測定法の検討

そこで KDR を正確にフローサイトメータで分析する方法を検討してみた。下図にフローサイトメータのイベント数と KDR 値の散布図を示す。16 万までイベント数を増やしているがイベント数と検出 KDR 数には十分な相関がなく、この程度のイベント数では正確に検出できないことがわかる。



フローサイトメータの機構から来る制限事項として、あまりイベント数を増やすと蛍光色素を非特異的に吸着する流路中のゴミや死細胞、表面にゴミを吸着した細胞の頻度が上昇する。この点から 10 万以上イベント数を上げるのは危険と言わざるを得ない。そこで何らかの細胞濃縮の方法が必要であるが細胞濃縮を行うと絶対数の信頼性が低下するので濃縮時の測定値は%値となる。以下に正確な測定プロトコールの案を示した。

ステップ 1

血液を 20ml 採取する。平均 $1\mu\text{L}$ あたり 0.9 個の CD 3 4 陽性細胞を含むので計算上は平均で 18000 個程度の CD34 陽性細胞を含む。

ステップ 2

約 1ml を用いて我々の開発した CD34 高感度法で μL あたりの CD34 絶対数を測定する（あるいはプロカウントでも可能）。

ステップ 3

残り全部の血液をフィコール処理し、赤血球と好中球を除く。白血球分画比にもよるがこれで 2 - 3 倍に濃縮される。収率は 70%-80% 程度のことが多い (CD34 で 12000 個)。

ステップ 4

磁気ビーズを用いて lineage removal を行う。通常これにて 50 倍の濃縮が得られる。収率は細胞数によるが通常 50%-20% である (CD34 数で 6000-3000 個)。

1-3% の CD34 陽性細胞の濃度になる。この段階で 100 倍程度の濃縮が得られる。

ステップ 5

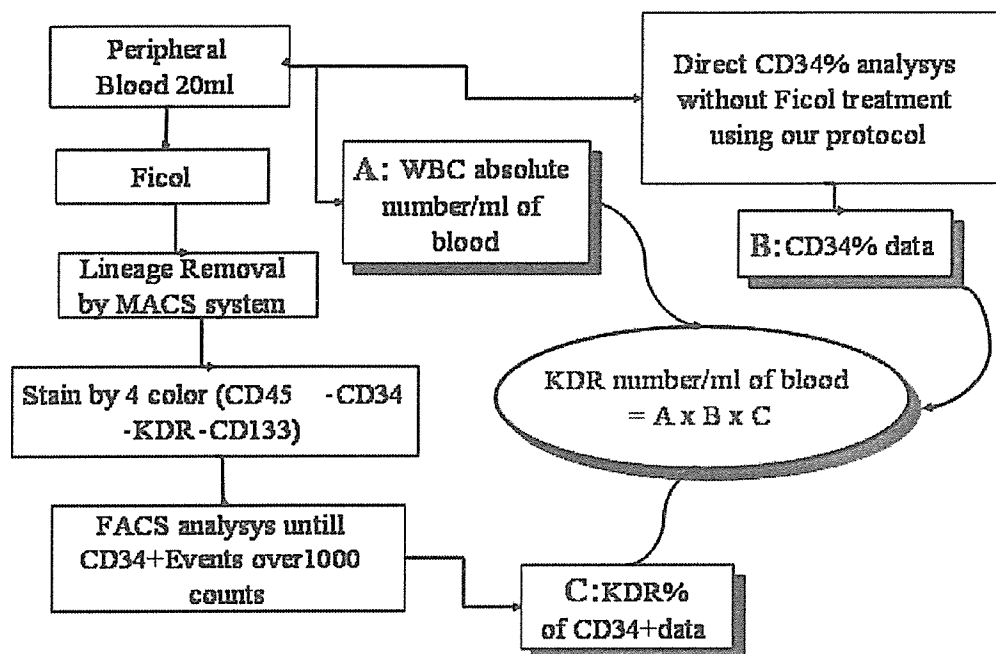
CD45—CD34—KDR の 3 重あるいは CD133 を加えた 4 重染色を行う。

ステップ 6

イベント数を 10 万程度取り、CD34 で最低 1000 イベントを目指す。これで CD34 陽性細胞数の最も少ない患者でも 20 前後の KDR 細胞集団が FACS 画面上確認できると考えている。

下図に作業フローを示す。

Our proposed protocol for the accurate EPC/KDR measurement



E. 結論

末梢血中の CD34 陽性細胞数と虚血性心疾患の関連を明らかにするとともに、フローサイトメータによる血管前駆細胞の定量法を提案した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

投稿準備中。

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

末梢血CD34陽性細胞数と虚血性大脳白質病変との関連

分担研究者

北川 一夫 大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学 講師

共同研究者

星 拓 大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学 医師

研究要旨

一般高齢者に脳画像検査でみられる大脳深部白質病変は、加齢・高血圧との関連が知られ、脳内の細小動脈病変がその主要な原因であると考えられている。さらに将来の認知機能低下や脳血管障害の発症との関連についても報告されている。しかし、病変の進展や認知機能低下に対する有効な治療法は明らかとなっていないのが現状であり、白質病変の病態をより詳細に検討することは重要であると考えられる。白質病変の病態に血管系の修復・維持機構が関連しているかどうかを明らかにすることで痴呆の治療戦略上有益な情報が得られるかもしれない。骨髄由来のCD34抗原陽性細胞は、血管系の維持・修復に役割を果たすことが知られている血管内皮前駆細胞系の幹細胞に含まれ、虚血性心疾患の治療に有効性が報告されている。また末梢血中での細胞数の測定が虚血性心疾患の病態を反映している報告も認められる。今回少数例ではあるが、外来患者

を対象に、頭部MRI画像上の白質病変の重症度と末梢血中のCD34抗原陽性細胞数との関連を検討した。本研究で白質病変の重症度と末梢血中の血管系幹細胞数の低値に有意な関係がみられ、白質病変の病態に血管系の維持・修復機構が関与している可能性が示唆された。しかしながら、心血管疾患の危険因子などの因子との独立した関連を示されなかった。今後、登録症例数を増やし、さらに白質病変の進展と幹細胞数に関連が認められるかどうかを前向きに検討を行う。

A. 研究目的；血管の維持や修復に重要な役割を果たすことが知られる骨髄由来の幹細胞の移植が難治性の虚血性心疾患に対する新しい治療戦略として臨床応用され、その有用性が報告されている。またそれらの幹細胞は末梢血中にも同定され、虚血性脳血管障害における検討から末梢血中の血管内皮前駆細胞系の幹細胞に含まれるCD34、CD133抗原陽性細胞数の低値と脳梗塞数の高値、脳主幹動脈病変を有する患者の慢性虚血部位の脳血流量の低下との関連が示され、脳血管病変において末梢血中の幹細胞数が病態を反映している可能性が考えられる。

高齢者に比較的好くみられる大脳深部白質病変は、主に脳の髄質動脈などの細小動脈が関係する虚血性病変であると考えられており、高齢者の認知機能低下の主要な原因の一つである脳血管性痴呆との関連が示されている。この白質病変の病態を解明することは、血管性痴呆の治療戦略上重要であると考えられるが、現在のところ、その治療・予防のみならず診断に関しても明確にはなっていないとは言えない。大脳深部白質病変の病態を明らかにするため、虚血性白質病変の重症度と末梢血中の血管内皮前駆細胞の内のCD34陽性細胞数の関連性を検討することとした。

B. 研究方法；対象は、虚血性脳血管障害の既往例及び心血管疾患の危険因子を少なくとも一つ以上有し、当科外来を定期的に通院中の患者42例（男25例、女17例、平均年齢68.9歳、脳梗塞10例）に頭部MRI検査を施行し、検査後1ヶ月以内に採血した末梢血中のCD34陽性細胞数を計測。頭部MRI検査は、T1強調画像、T2強調画像、FLAIR画像にて大脳深部皮質下白質病変(DSWMH)と側脳室周囲白質病変(PVH)のそれぞれをFazekas等の重症度分類方法(各重症度:0-3度)に基づいて評価した。また全例にMMSEを施行した。採血は文書による同意を得た上で施行し、末梢血中のCD34抗原陽性細胞数を採血後48時間内に大阪南医療センター臨床研究部に依頼して測定した。

末梢血中のCD34抗原陽性細胞数と年齢、性別、心血管疾患危険因子の関連および頭部MRI画像上の白質病変重症度との関連を検討した。

C. 研究結果；解析対象42例の患者特徴としては、心血管疾患の危険因子を少なくとも一つ以上有しており、その内訳は高血圧29例(69%)、高脂血症25例(59.5%)、糖尿病9例(21.4%)、喫煙歴21例(50%)であった。それら危険因子のコントロール状況は、血圧、空腹時血糖値、血清脂質値ともに比較的良好であった。血圧、血清脂質値、血糖値や頸動脈肥厚度などの臨床パラメータと末梢血CD34抗原陽性細胞数との関係を単相関で見ると収縮期血圧値のみに弱い負の相関 ($\rho = -0.386$, $p = 0.048$) がみられたが、他の因子との有意な相関関係は見られなかった(表1)。大脳深部白質病変の重症度の分布(図1)は、PVHではGrade3, Grade2, Grade1がそれぞれ3例(7.1%), 15例(35.7%), 18例(42.9%)であり、DSWMHはGrade3, Grade2, Grade1がそれぞれ4例(9.5%), 12例(28.6%), 19例(45.2%)でMMSEが23点の患者は1名のみで他の全ての患者は24点以上であった。白質病変の重症度は

やや進行例の割合が多い傾向であり、重症度とCD34陽性細胞数との関係をPVH, DSWMHの個々にみると各病変の重症度とCD34陽性細胞数の相関係数は、PVHで $\rho = -0.352$ ($p=0.022$)、DSWMHで $\rho = -0.221$ ($p=-0.160$) であった。さらに、両病変を合わせた白質病変の重症度 (Grade0-6) とCD34陽性細胞数との関係でも有意な負の相関 ($\rho = -0.309$, $p=0.047$) がみられた。しかし白質病変の重症度とCD34陽性細胞数の関係は年齢・性別や心血管疾患などの他の因子との独立した関係はみられなかった。また白質病変を重症度に応じてgrade2以下とgrade3以上の2群に分けてCD34抗原陽性細胞数を比較するとgrade3以上の重症群において有意に細胞数の低値を示した (図2)。

D. 考察；明らかな痴呆の既往がなく、心血管疾患の危険因子を有する少数の患者群において、脳MRI画像検査上の皮質下の白質病変と末梢血中のCD34抗原陽性細胞数に負の相関関係がみられた。この結果、従来から報告されてきている白質病変に血管障害の病態が関係しているという従来の報告を支持する結果が得られた。さらには、その機能障害 (慢性低灌流) に血管の修復・維持に関する機序が関わっている可能性が示唆された。また末梢血中での幹細胞の数が脳における血管系の障害を反映しているかもしれない。しかし今回の検討では、白質病変の重症度とCD34抗原陽性細胞数との間に独立した関係をしめすことはできておらず、この関係は様々な因子に修飾されている可能性がある。また、対象が少数例であることや虚血性病変以外の病態を有する患者を完全に除外できていないことがこの結果に影響していることは否定できない。白質病変と末梢血中のCD34抗原陽性細胞数の関係すなわち白質病変の進展に脳内の細小動脈の修復・維持の機序が関わり、それが末梢血中の幹細胞数を計測することによって予見できるかどうかについて、今後、縦断研究を行っていく必要があると思

われる。

E. 結論；心血管疾患の危険因子を有する群において、脳画像検査上にみられる大脳深部皮質下の白質病変の重症度の増加に末梢血中のCD34抗原陽性細胞数の低下が関係している可能性が示され、白質病変の病態に血管系の修復・維持機構が役割を担っている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 引用文献

- 1) Taguchi A, Matsuyama T, Moriwaki H., et al. (2004) Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function. *Circulation*, 109:2972-2975.
- 2) Roman GC, Erkinjuntti T, Walin A., et al. (2002) Subcortical ischaemic vascular dementia. *Lancet Neurol*, 1(7):426-436.
- 3) Werner N, Kosiol S, Schiegl T., et al. (2005) Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*, 353:999-1007.

H. 研究発表

1. 論文発表

Hoshi T, Kitagawa K., et al. (2005) Relations of serum high-sensitivity

C-reactive protein and interleukin-6 levels with silent brain infarction.
Stroke, 36(4):768-72.

2. 学会発表

Hoshi T, Kitagawa K, Yamagami H., et al. Increased levels of serum high-sensitivity C-reactive protein and Interleukin-6 are associated with silent brain infarction. 2005 International Stroke Conference. New Orleans, USA, February 2-4, 2005

I. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表 1. 対象患者の臨床特徴と CD34 との相関

	Mean±SD or n(%)	ρ or r	P
年齢, y	68.9±7.1	-0.221	NS
男性	25(59.5)	0.234	NS
Body mass index	22.6±2.0	-0.133	NS
喫煙 Never	21(50.0)		
Quitter	14(33.3)		
Current	7(16.7)	0.166	NS
高血圧	29(69.0)	-0.159	NS
高脂血症	25(59.5)	-0.094	NS
糖尿病	9(21.4)	-0.086	NS
脳梗塞	10(23.8)	0.125	NS
白質病変(Grade1/2/3)			
PVH, n	18/15/3	-0.352	0.022
DSWMH, n	19/12/4	-0.221	NS
WML		-0.309	0.047
収縮期血圧, mmHg	136.6±17.2	-0.386	0.039
拡張期血圧, mmHg	78.5±10.8	-0.286	NS
Total-cholesterol, mg/dl	202.1±32.9	0.124	NS
Triglyceride, mg/dl	105.2±83.5	0.107	NS
HDL-cholesterol, mg/dl	62.8±23.2	-0.209	NS
Blood glucose, mg/dl	104.0±28.8	0.121	NS
MMSE	27.8±1.8	-0.137	NS
Mean-mIMT, mm	1.25±0.53	-0.050	NS

WML=PVH+DSWMH

図1 白質病変の分布

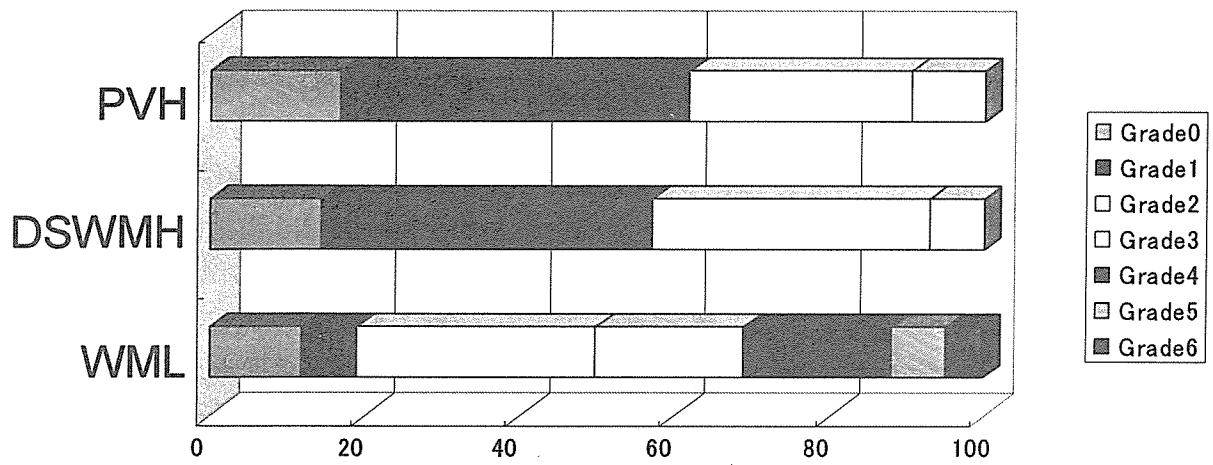
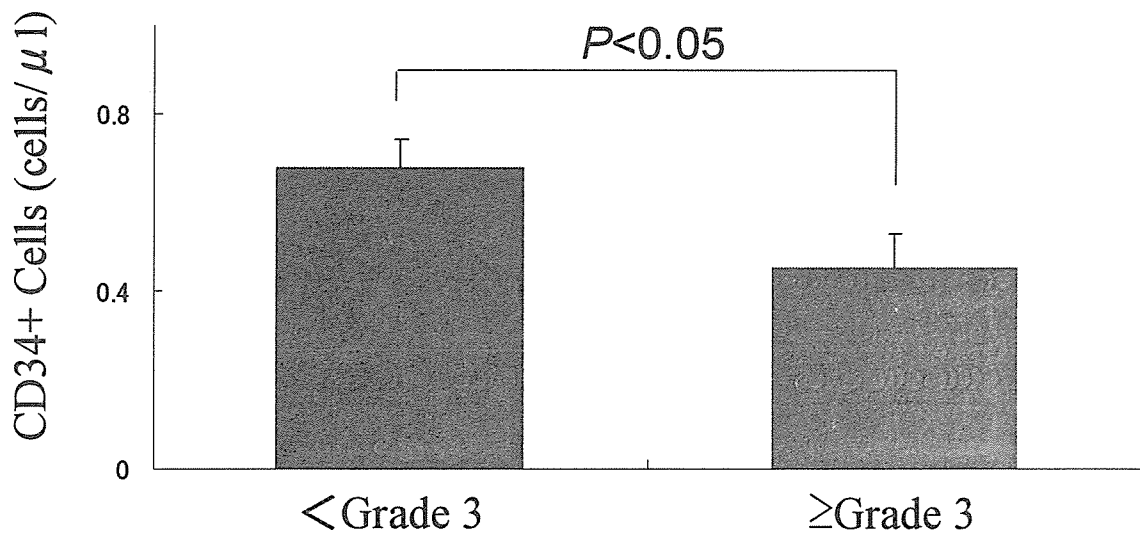


図2 白質病変の重症度とCD34抗原陽性細胞数



分担研究課題名

ハイリスク患者における予後の解析

分担研究者

丸山 彰一

名古屋大学医学部附属病院腎臓内科講師

研究要旨

慢性腎疾患が脳および心血管事象に対する危険因子となることが明らかとなってきたが、特に維持透析を行っている患者はハイリスク患者であり、この集団における予後の解析は透析患者のみならず非透析患者の診断・予防・治療に役立つ重要な情報を提供するものと期待される。そこで我々は、1) 透析患者では血管内皮前駆細胞や骨髄幹細胞が減少していて、このことが血管事象の発病を促進する、2) 不足した幹細胞を投与することで血管事象の発生が抑制される、という仮説を立て、このことを実証するための研究を行った。その結果、①透析患者ではコントロール群と比較して有意に減少していること、②1年間の前向き研究の結果、透析患者のうちCD34が少ない群では比較的保たれている群では比較して全死亡率および血管事象による死亡率ともに有意に高いこと、さらに③動物モデルを用いた検討においては、骨髄由来幹細胞投与がG-CSFとの併用によりシスプラチン腎症に対する治療効果があることを明らかにした。