

図 1 : Isotype-matched IgGによる
コントロール測定

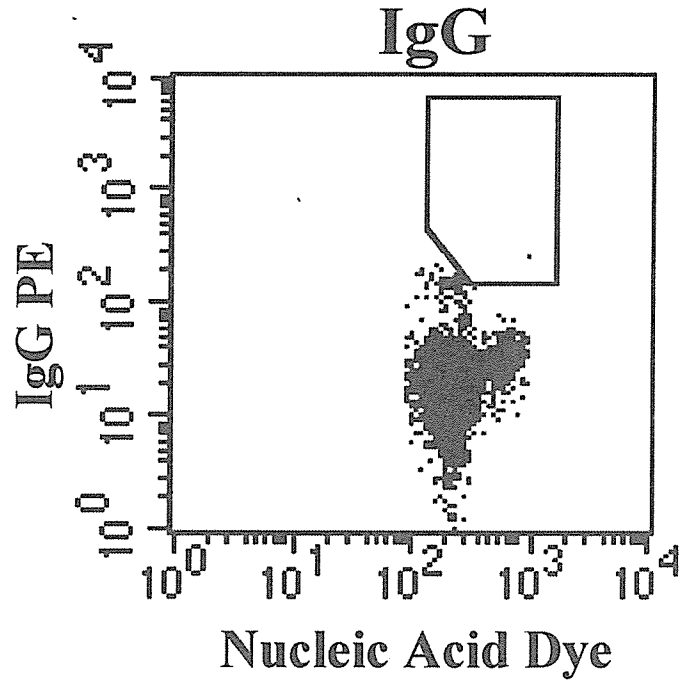


図 2 : Anti-CD34 Antibodyによる測定

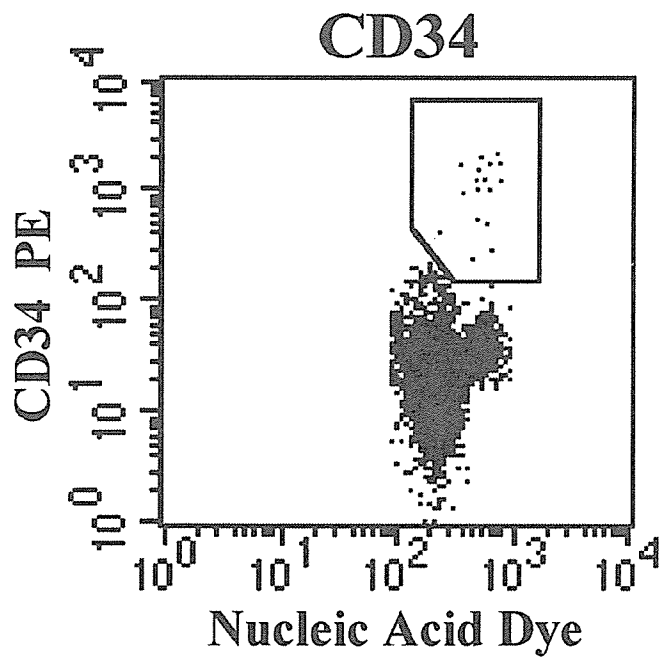


図3 : 細胞濃縮後のIgGによる
コントロール測定

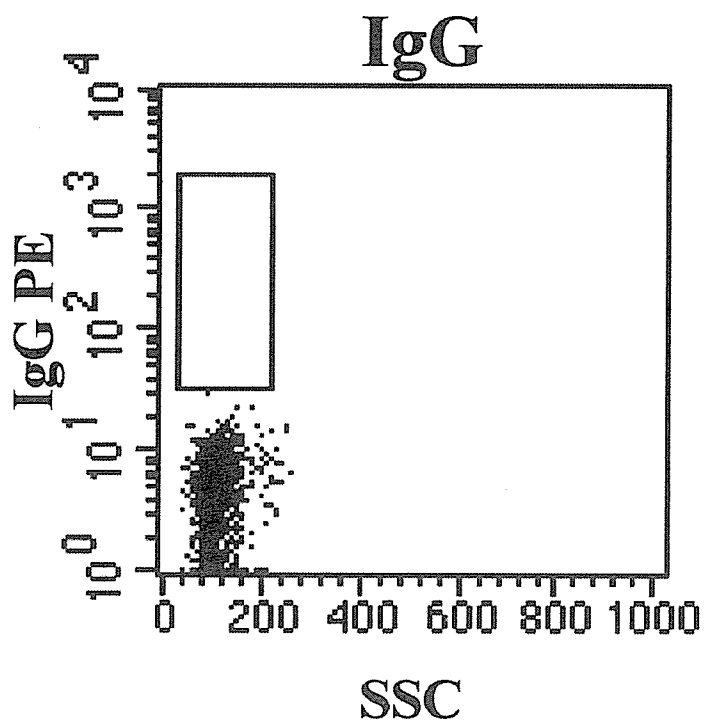


図4 : Anti-CD133 Antibodyによる測定

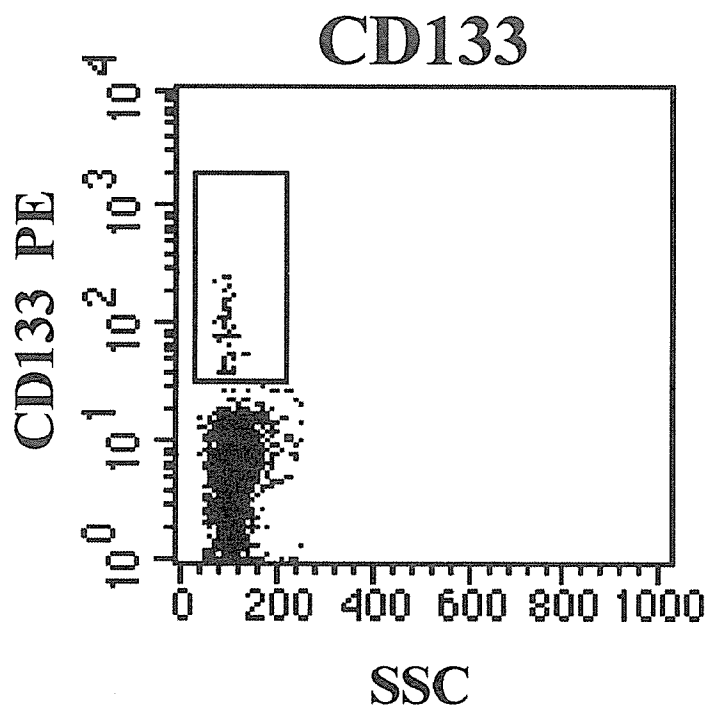


図 5 : Anti-CD117 Antibodyによる測定

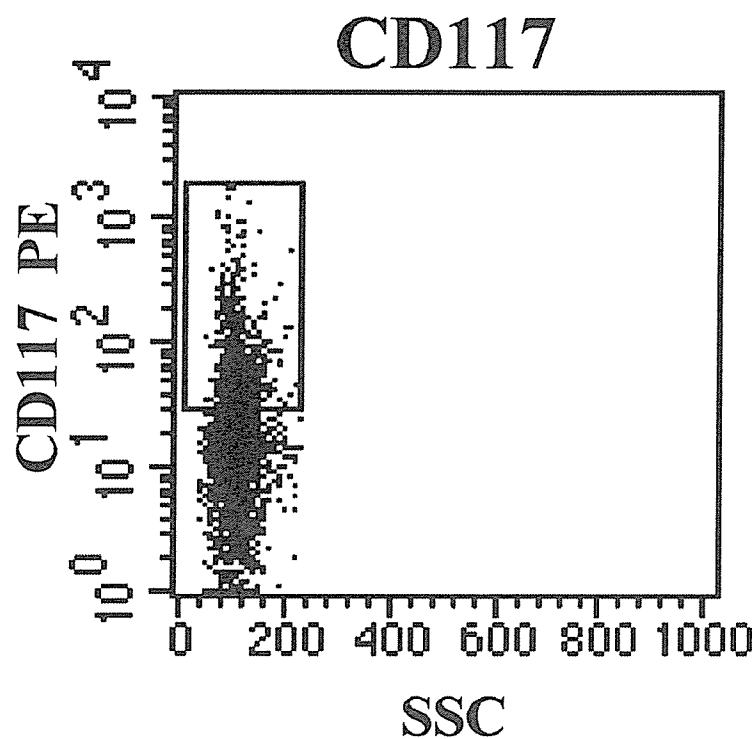


図 6 : Anti-CD135 Antibodyによる測定

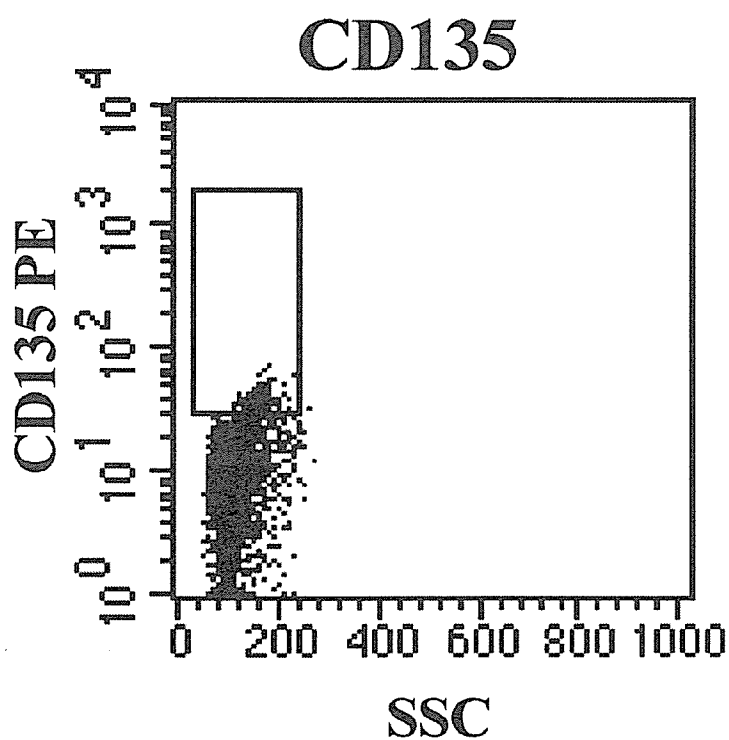


図 7 : 急性期脳梗塞後の末梢血中
CD34陽性細胞の推移

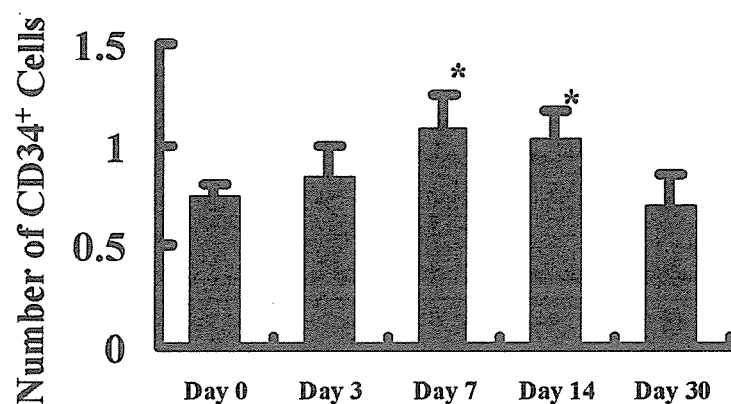


図 8 : 正常人における末梢血中
CD34陽性細胞と年齢の相関

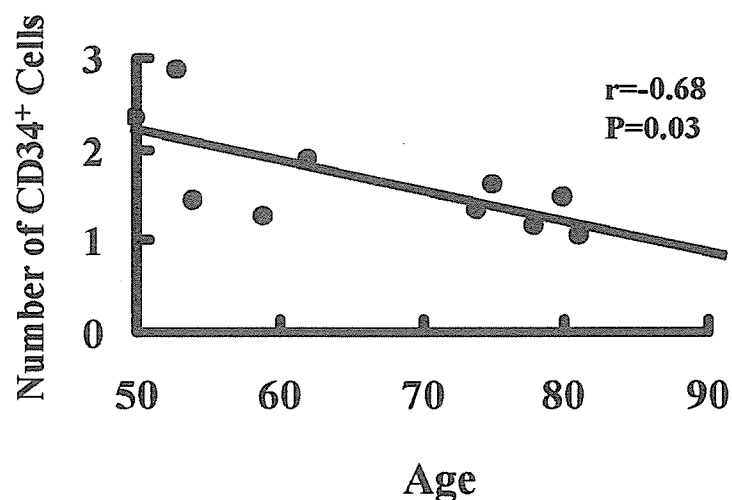


図 9 : 脳梗塞患者における末梢血中 CD34陽性細胞と年齢の関連

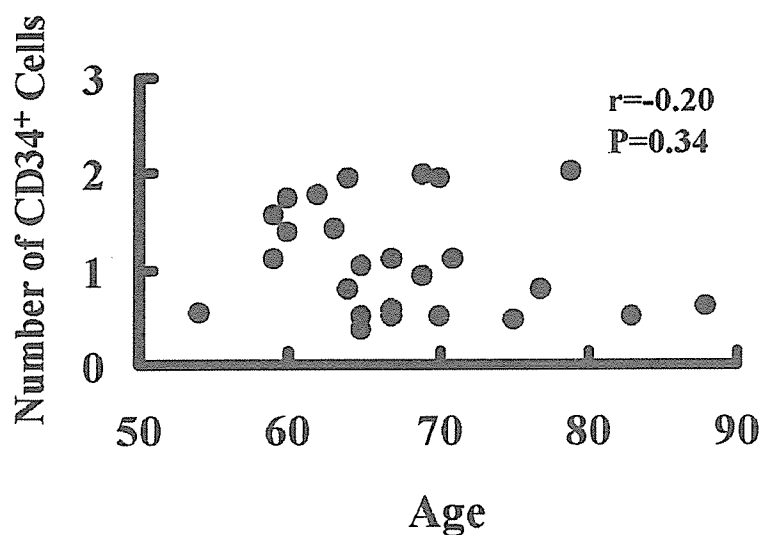


図 10 : 末梢血中幹細胞数と頸動脈動脈硬化性病変との関連

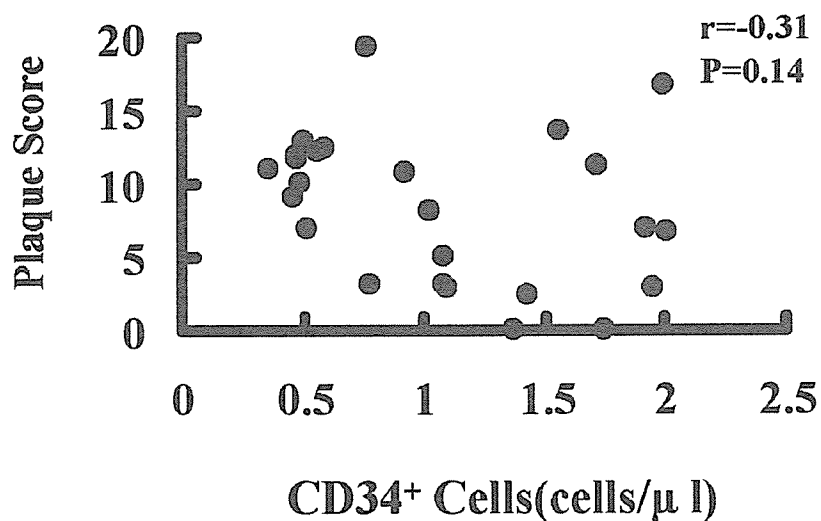


図 1 1 : 末梢血中CD34陽性細胞とMRI上観察される虚血性病変との関連

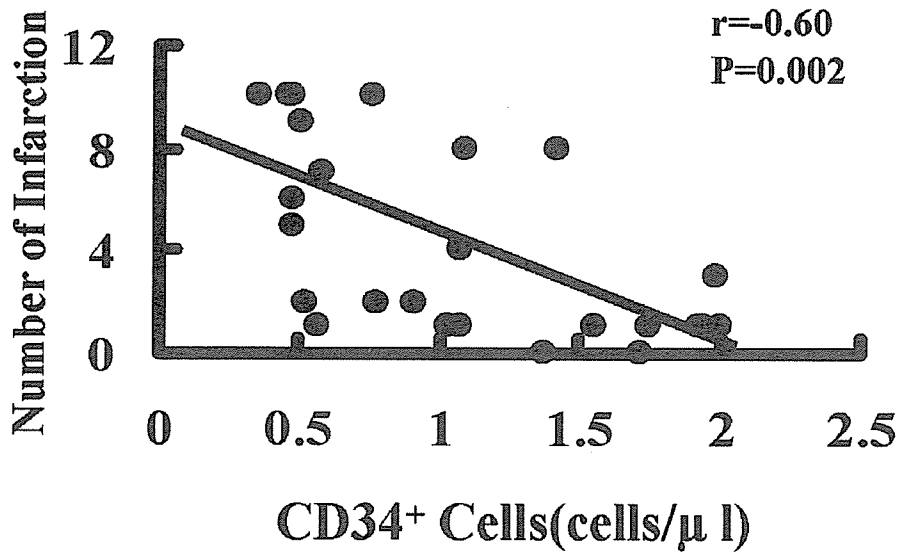


図 1 2 : 末梢血中CD133陽性細胞とMRI上観察される虚血性病変との関連

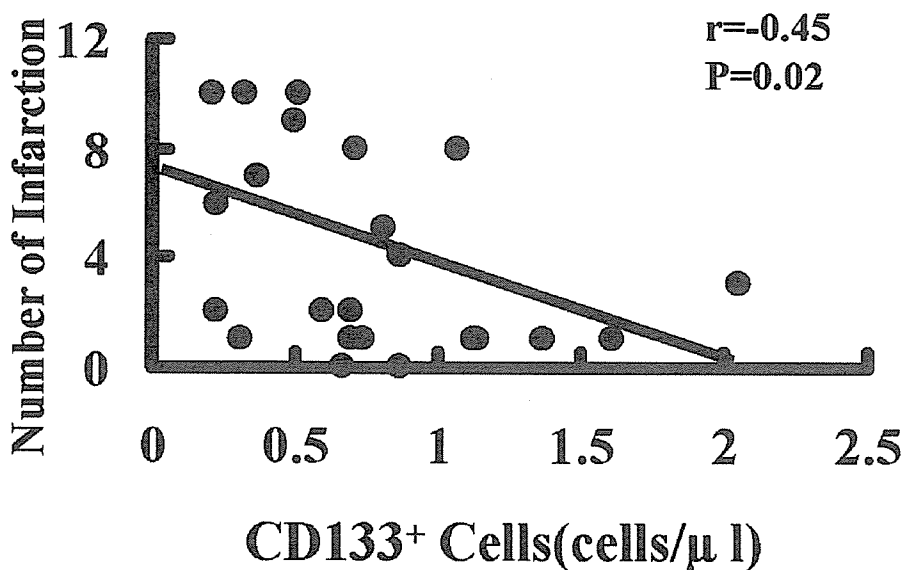


図 1 3 : 末梢血中CD117陽性細胞とMRI上観察される虚血性病変との関連

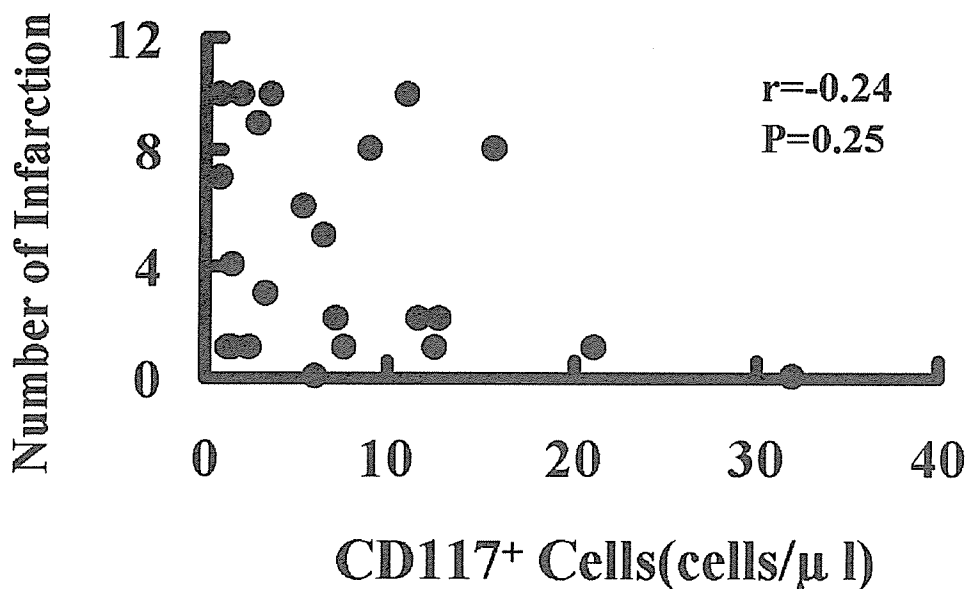


図 1 4 : 末梢血中CD135陽性細胞とMRI上観察される虚血性病変との関連

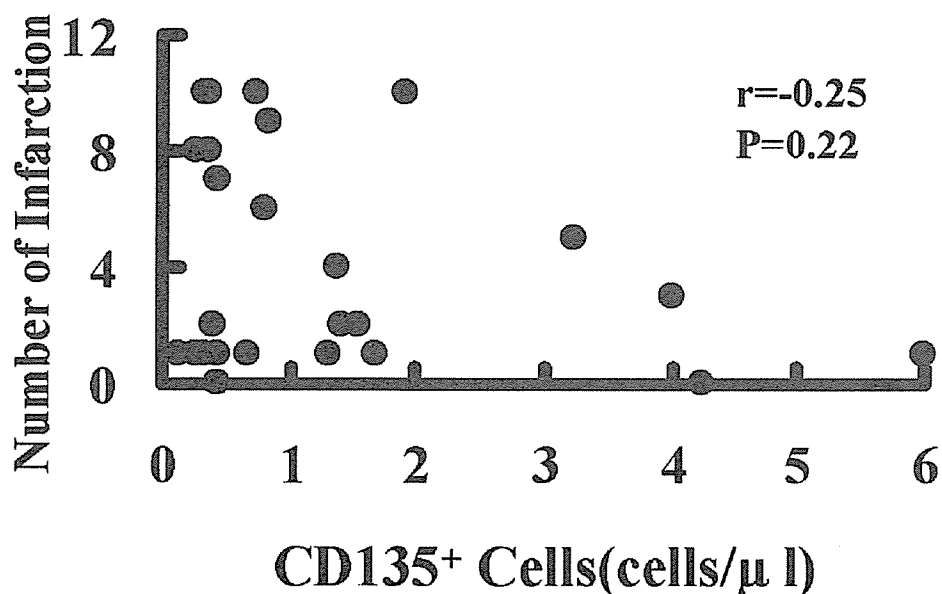


図 1 5 : 末梢血中CD34陽性細胞と
脳血流との関連

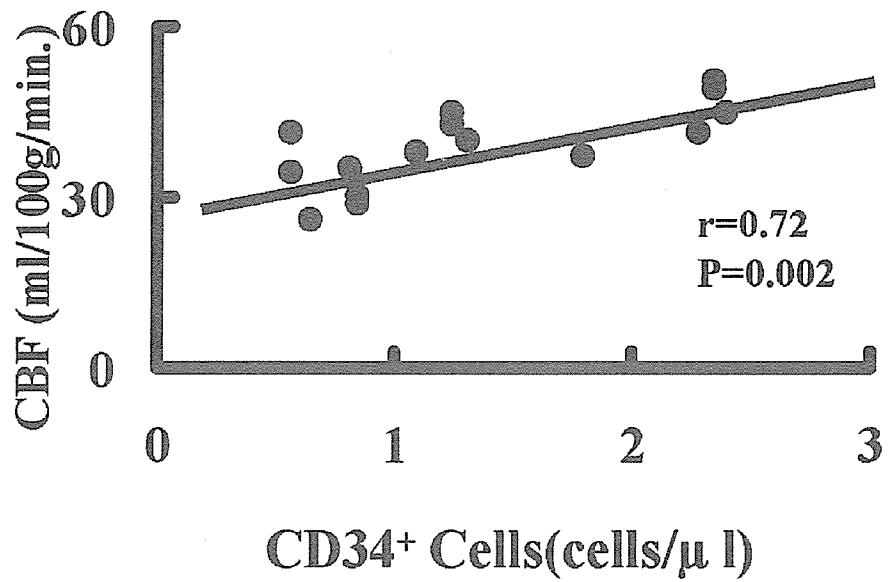


図 1 6 : 末梢血中CD34陽性細胞と
脳血流との関連

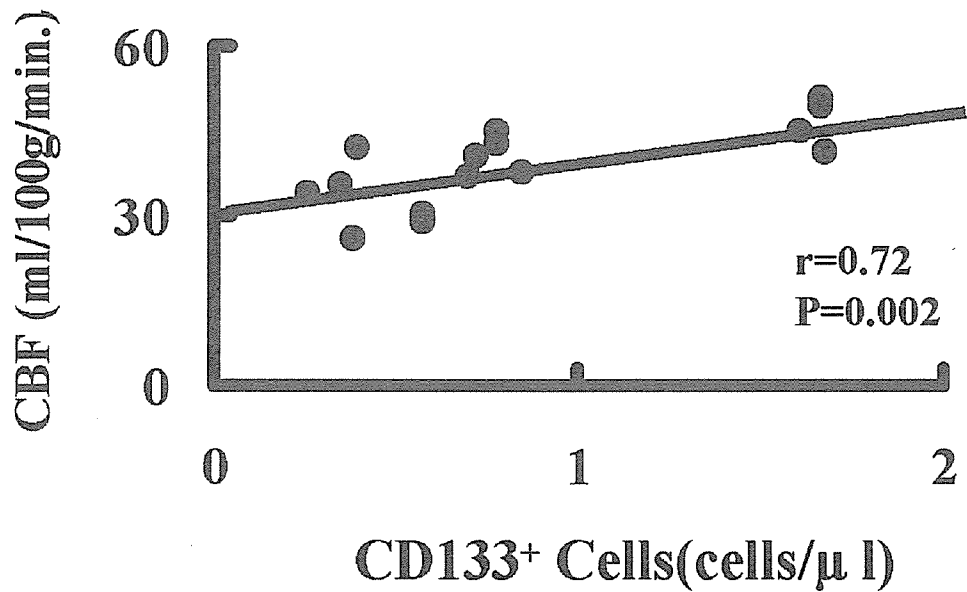


図 1 7 : 末梢血中CD34陽性細胞と
酸素摂取率との関連

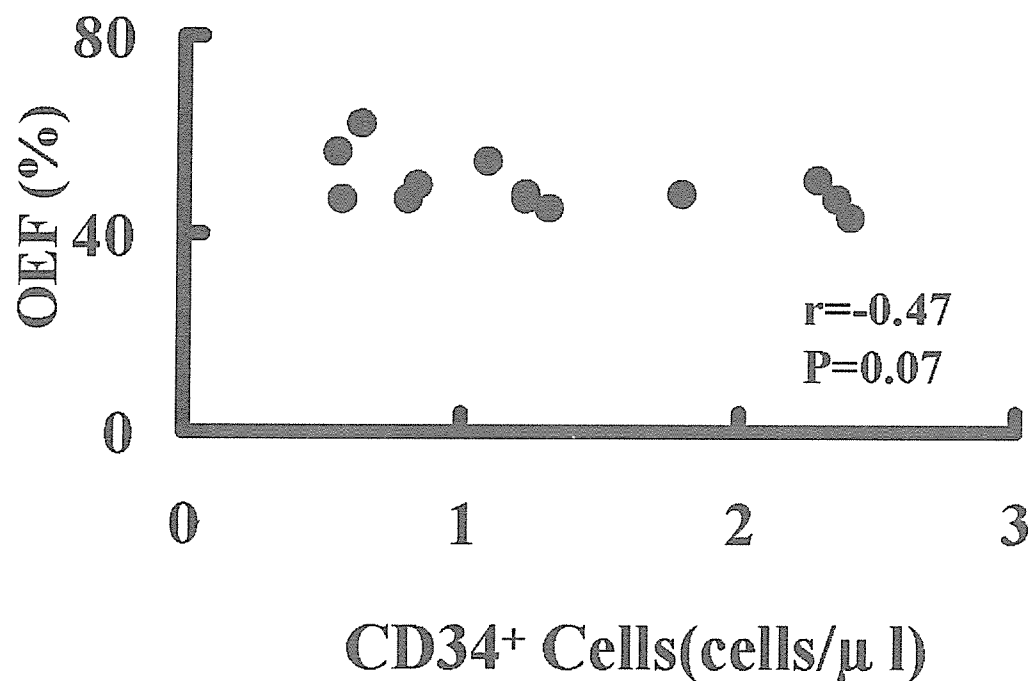


図 1 8 : 末梢血中CD34陽性細胞と
脳酸素代謝量との関連

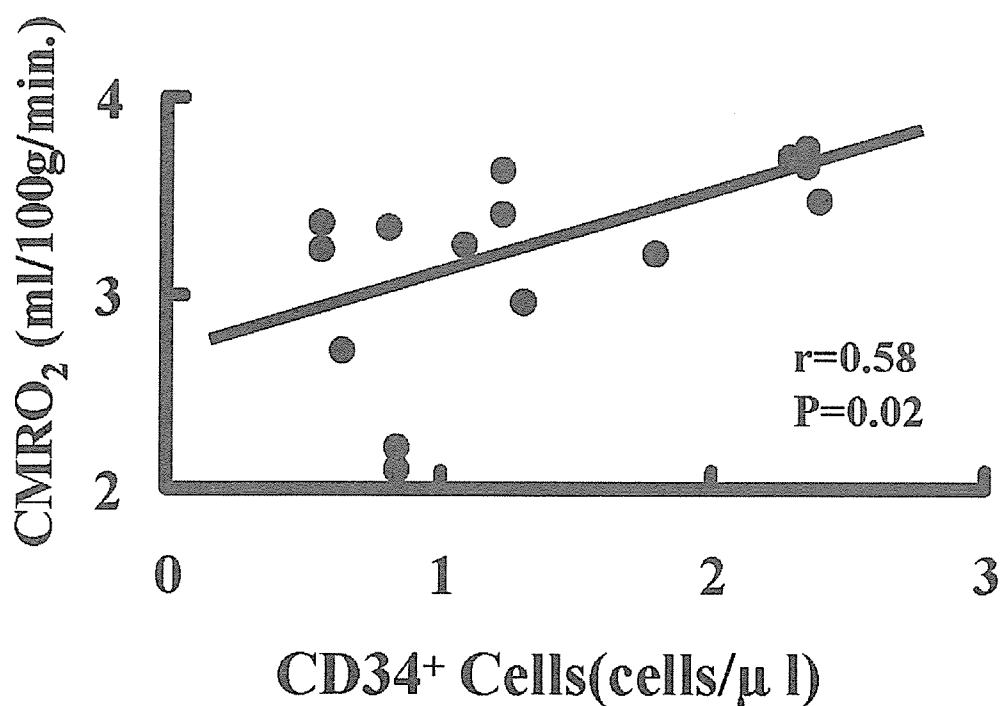


図19：糖尿病患者における末梢血中
CD34陽性細胞の減少

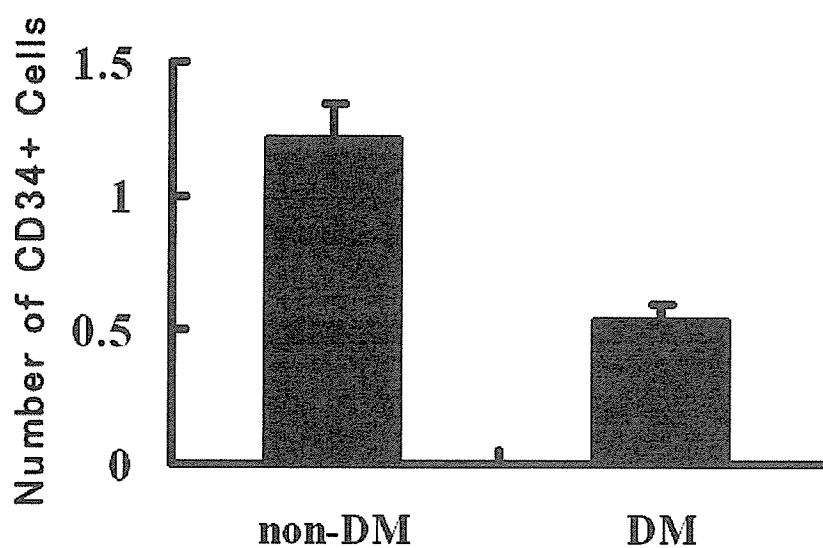
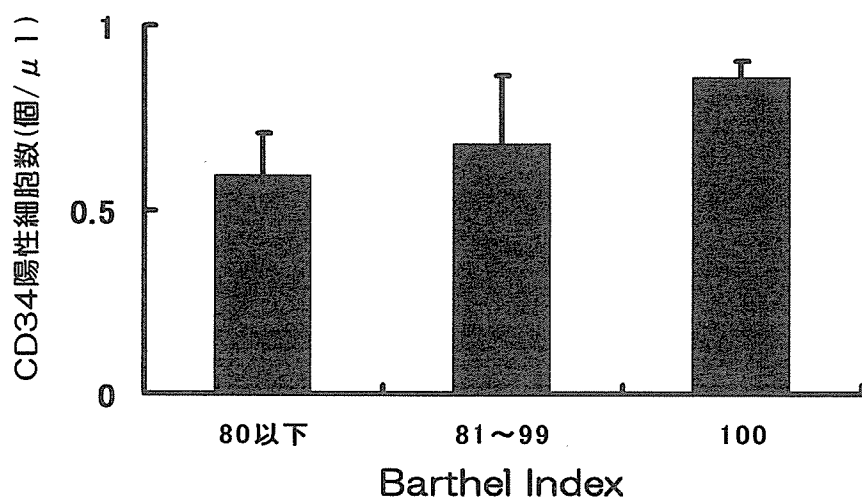
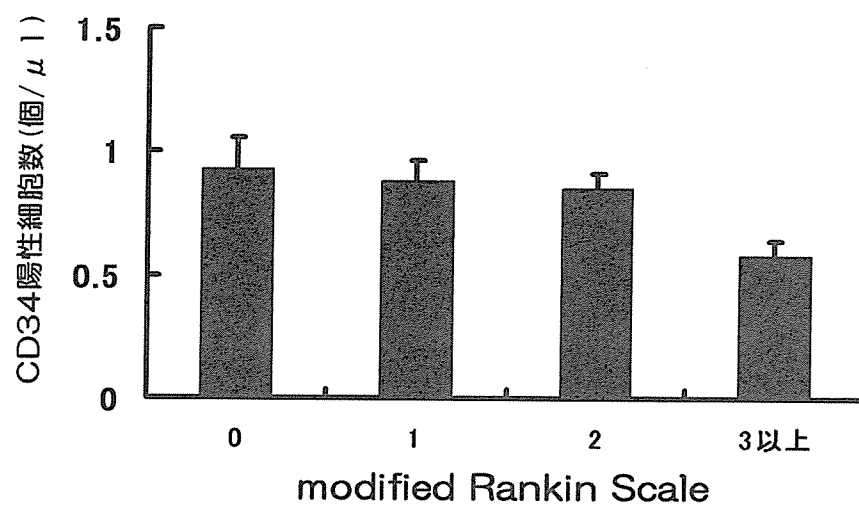


図20 CD34陽性細胞数とBI



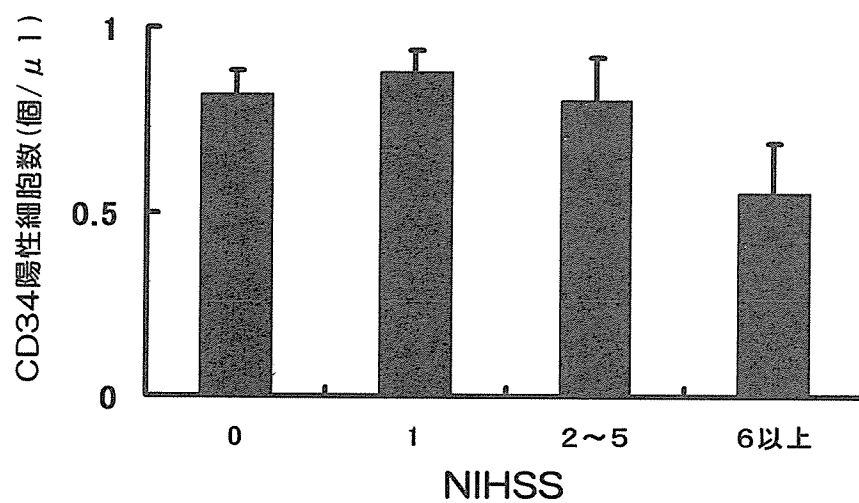
(有意な相関なし)

図21 CD34陽性細胞数とmRS



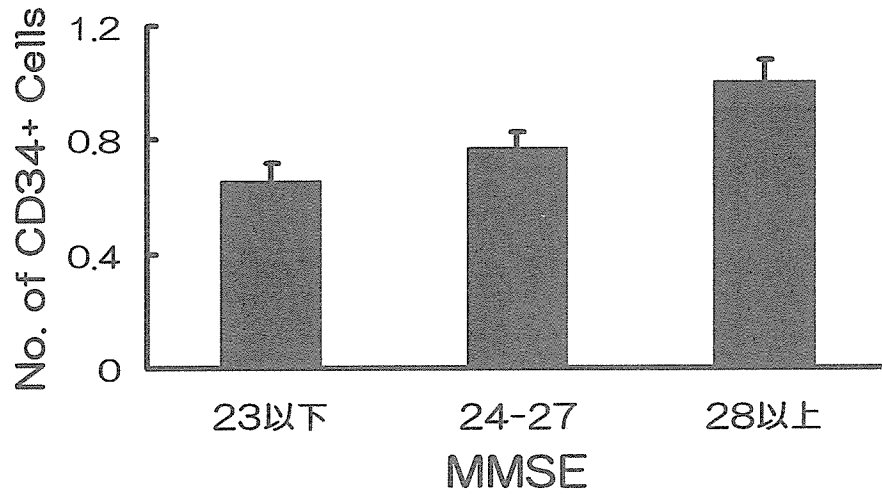
(有意な相関なし)

図22 CD34陽性細胞数とNIHSS



(有意な相関なし)

図23 CD34陽性細胞数とMMSEの関連



(MMSE28以上群とそれ以外の群での有意差あり)

図24 CD34陽性細胞数とMMSEの関連

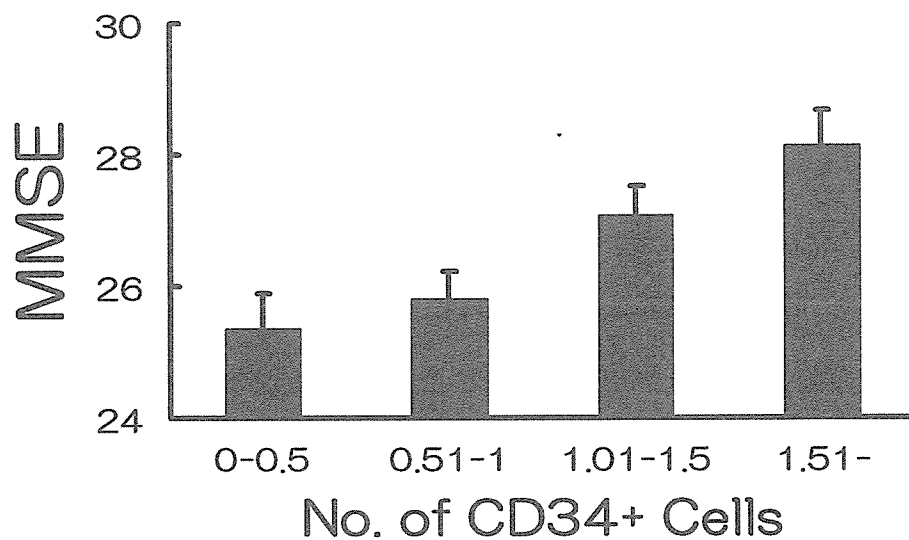


図25 CD34陽性細胞数とCDRの関連

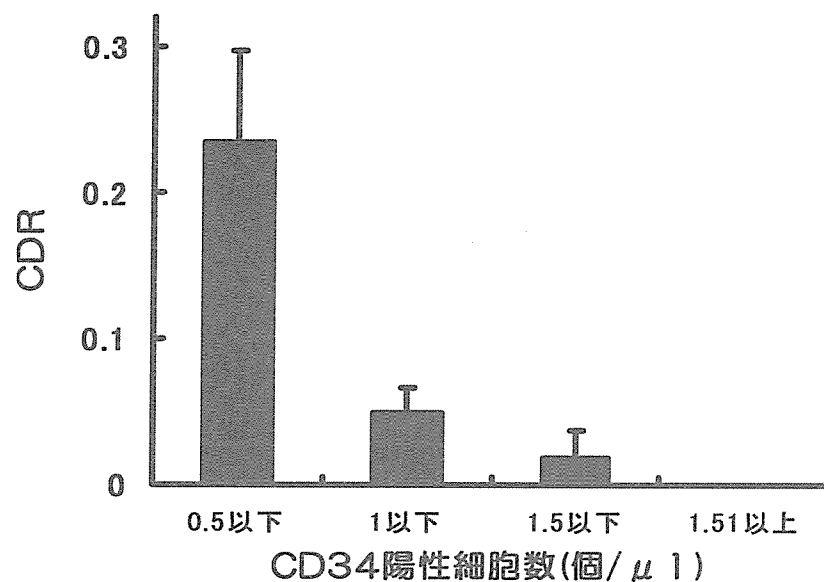
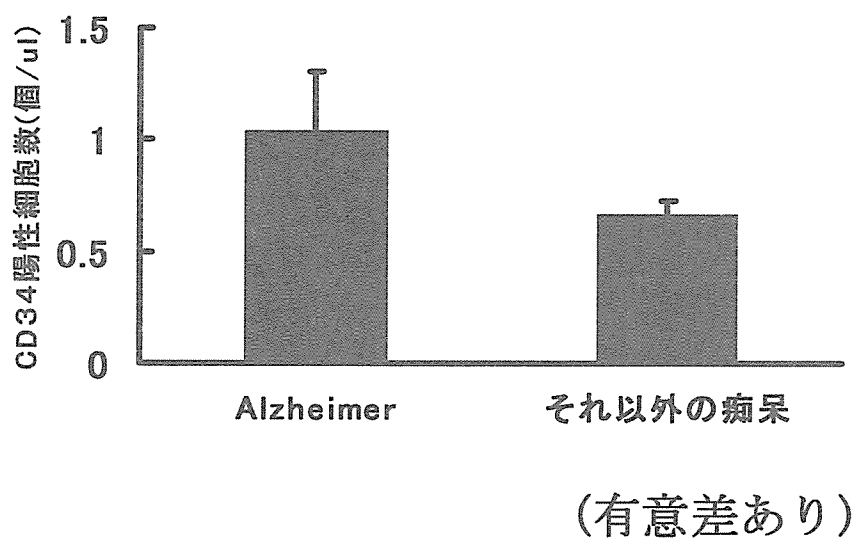


図26 CD34陽性細胞数と認知症の関連



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

分担研究課題

脳血管障害における末梢血 CD34 陽性細胞定量法の開発

分担研究者

相馬俊裕	国立病院機構大阪南医療センター	臨床検査科	部長
成富博章	国立循環器病センター	内科脳血管部門	部長
岡本昌也	国立病院機構大阪南医療センター	循環器科	医長
松山知弘	兵庫医科大学医学部	先端医科学研究所	教授

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およ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 (BeckmanCoulter, 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 1)、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 2)、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 3)、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 4)、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 5)。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 6)。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 7)。

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。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ールを改良した。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ールを改良し、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ールの測定結果に近い 0.019 ± 0.002 (range: 0.014%-0.038%) であった。取り除いた上澄みは解析したところ、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 CD 3 4 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

図1：死細胞を除いた領域Aの設定

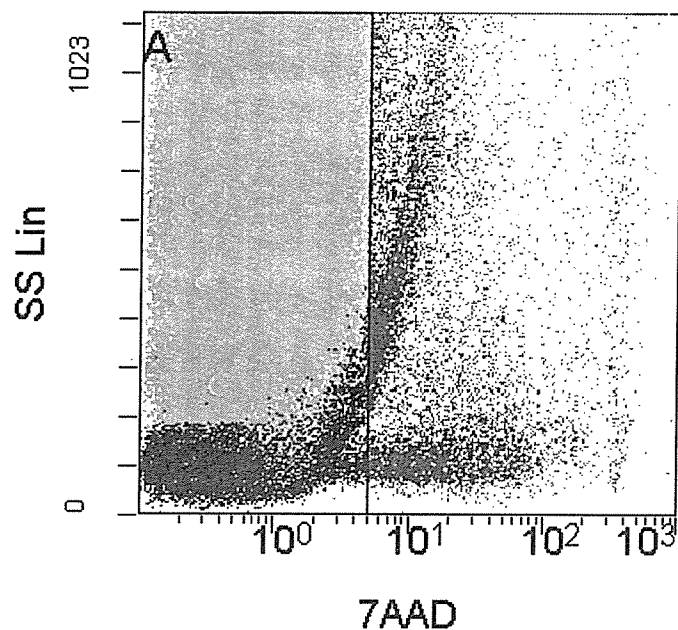


図2：すべてのCD45陽性細胞（白血球）を含めた領域Bの設定

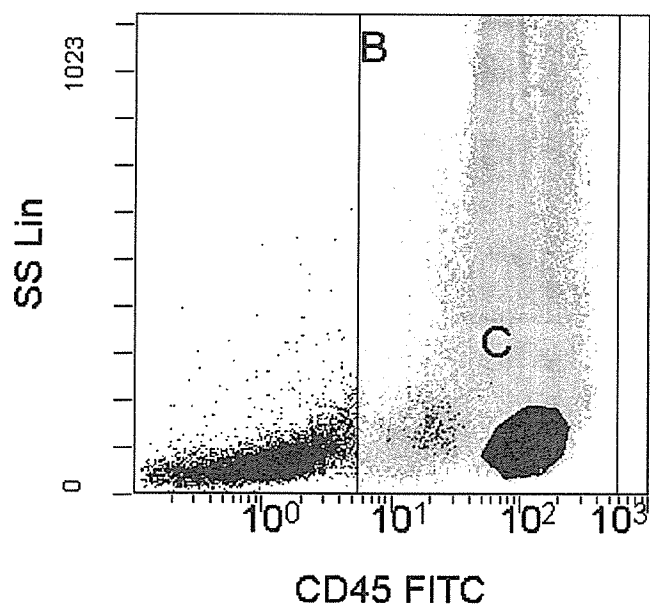


図3 : CD34陽性の血液細胞前駆細胞 (HPCs) を含めた領域Dの設定

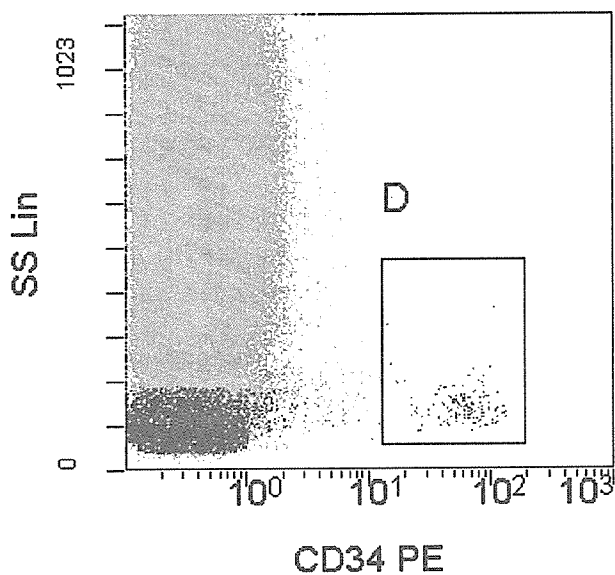


図4 : CD34陽性HPCsの集団に領域Eを設定

