

ステップ 1

血液を 20ml 採取する。平均 1 μ 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 μ L 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

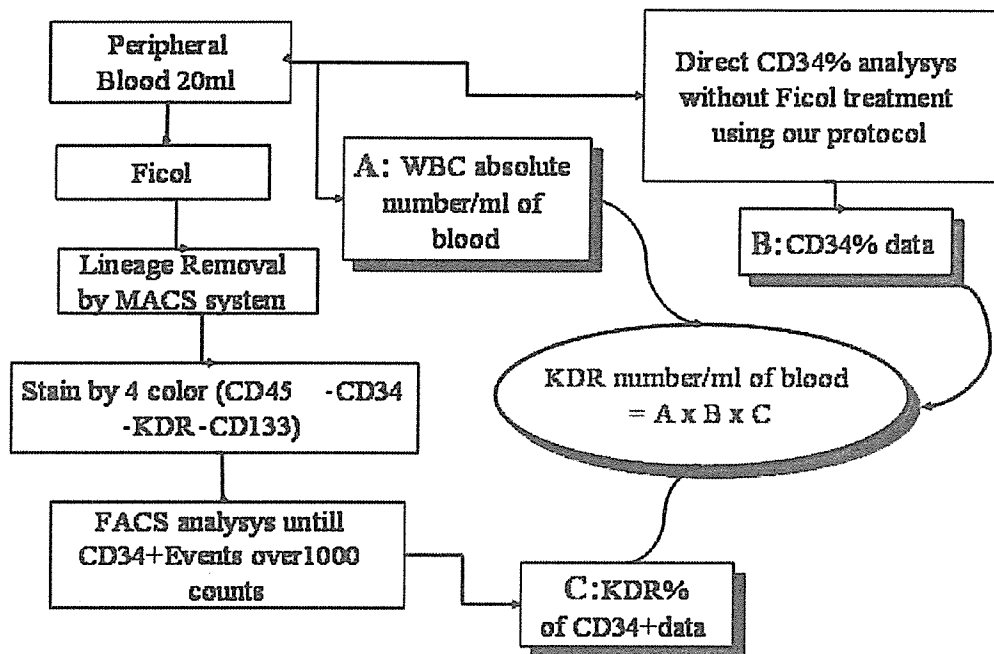
CD45-CD34-KDR の 3 重あるいは CD133 を加えた 4 重染色を行う。

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）研究報告書

臨床研究実施チーム（平成 16 年度 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 27）、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 28）、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 29）、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 30）、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 31）。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 32）。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 33）。

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. 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）研究報告書

臨床研究実施チーム（平成16年度b組）

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

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

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、について兵庫医科大学神経内科松山講師らと共に検討を行っている。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

国立循環器病センター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、測定による変動や誤差を最小限とするために、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ルを作成し、国立循環器病センター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。

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。また、共同研究者である兵庫医科大学神経内科松山講師らの予備研究

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¹⁾、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²⁾。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⁺ cells post-stroke enhances angiogenesis and neurogenesis in a murine model.

J Clin. Invest. 114: 330-389.

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（平成 16 年度 c 組）

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

（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

研究要旨

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。本研究チームでは、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を行っている。

研究目的

末梢血中の血管血球系幹細胞が同定されて以降、この幹細胞が心筋組織などの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。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。本臨床研究実施チームでは、本研究で得られた知見を基礎に新しい治療法として確立するための検討を行っている。

研究方法

質の高いトランスレーショナルリサーチの実施においては、外部機関による審査、登録、評価が必要不可欠である。本研究の推進に向けて神戸先端医療振興財団・臨床研究情報センターとプロトコルの作成および臨床応用に向けた準備を進めている。

結果

本臨床研究実施チームでは、以下の項目を網羅した試験実施計画書および使用細胞に関する概要書の作成を行っている。

0. シェーマ
1. 目的
2. 背景と根拠
3. 本研究で用いる診断規準及び定義
4. 適格規準
5. 登録
6. 治療計画
7. 有害事象の評価・報告
8. 観察・検査・報告項目とスケジュール
9. 目標症例数と研究期間
10. エンドポイントの定義
11. 統計学的考察
12. 症例報告書の記入と提出
13. モニタリング
14. 倫理的事項

15. 試験の費用負担
16. プロトコルの承認
17. プロトコルの改訂
18. 試験の終了と早期中止
19. 研究組織
20. 研究成果の帰属と結果の公表

考察

国立循環器病センターは、高度専門医療ナショナルセンターとして循環器疾患の克服を目標とした質の高い治験・臨床試験ができるよう体制の整備を進めている。本研究においても、世界的水準の介入臨床試験の実施に向けて準備を進めている。

図 1 : Isotype-matched IgGによる
コントロール測定

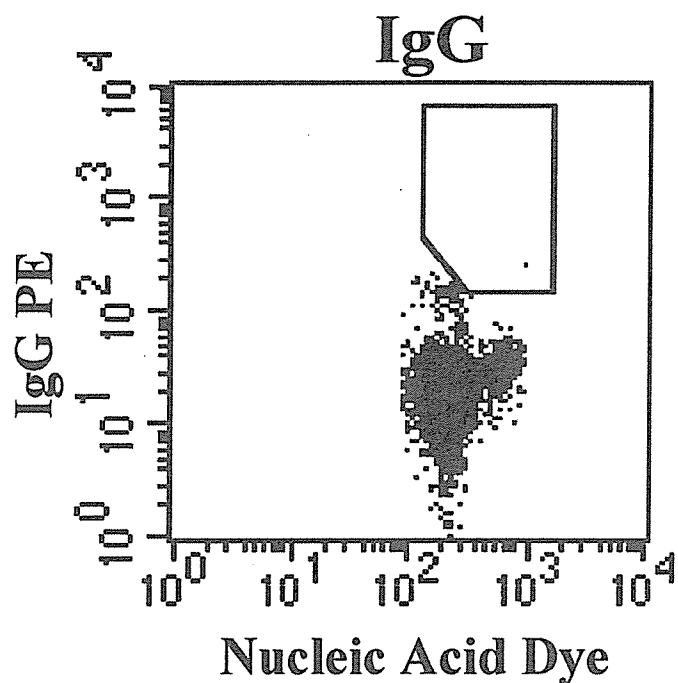


図 2 : Anti-CD34 Antibodyによる測定

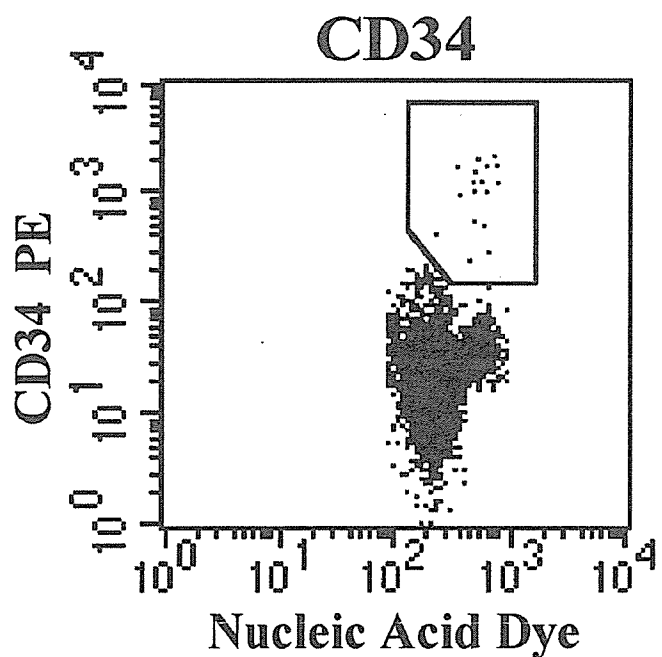


図3 : 細胞濃縮後のIgGによる
コントロール測定

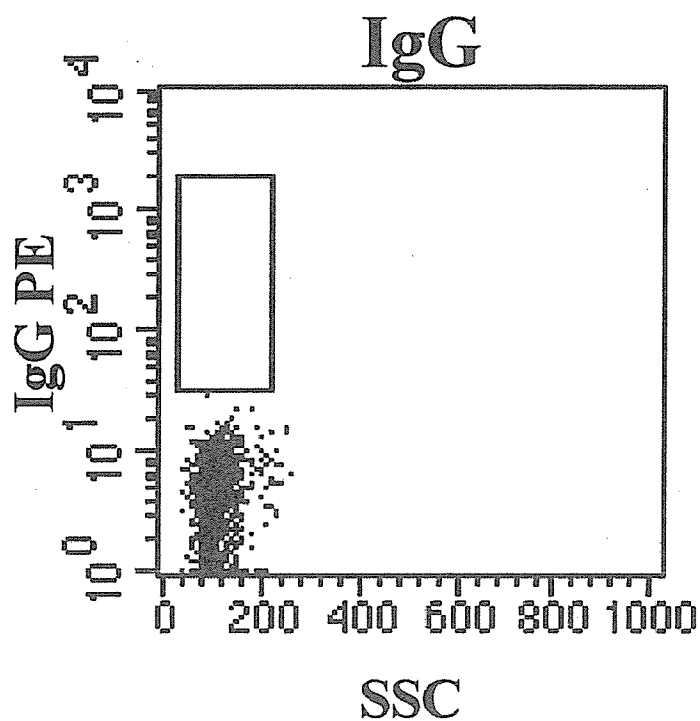


図4 : Anti-CD133 Antibodyによる測定

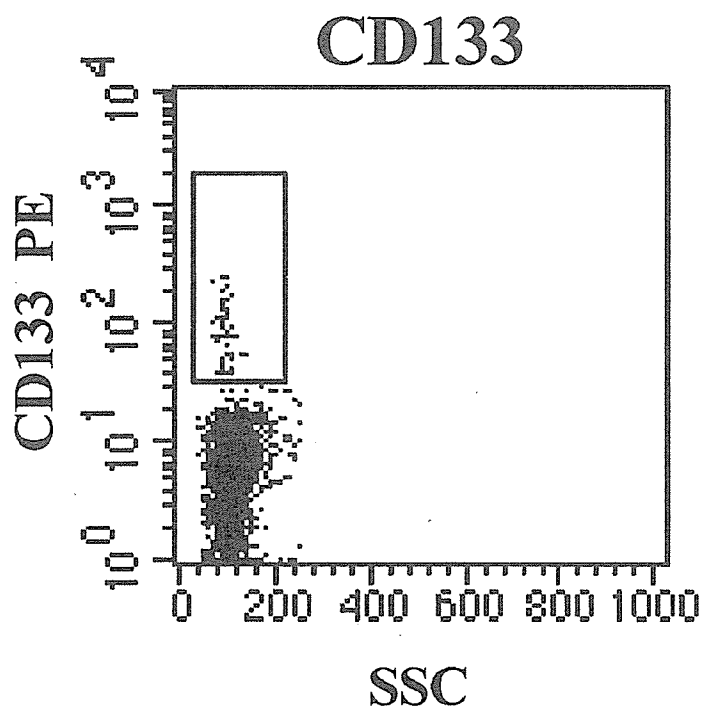


図 5 : Anti-CD117 Antibodyによる測定

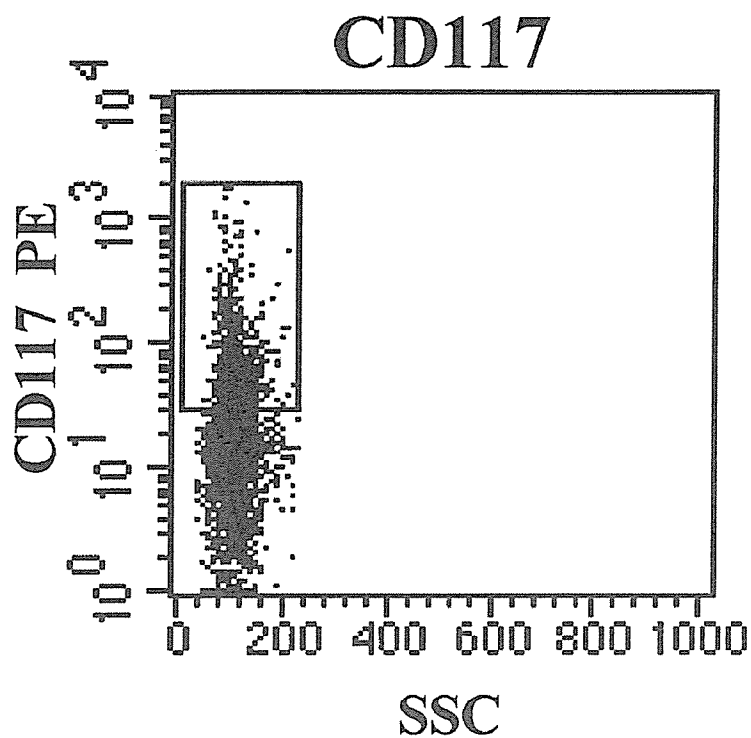


図 6 : Anti-CD135 Antibodyによる測定

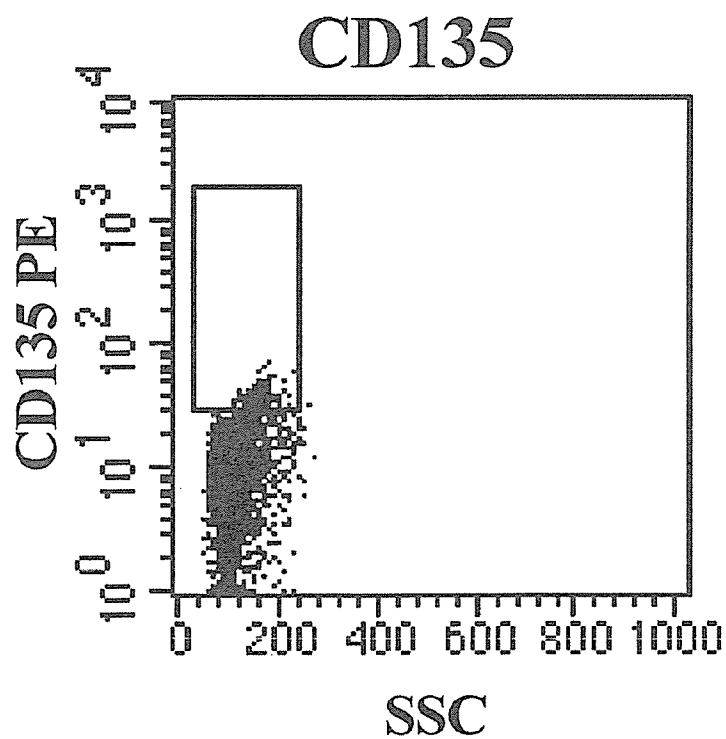


図 7 : 急性期脳梗塞後の末梢血中
CD34陽性細胞の推移

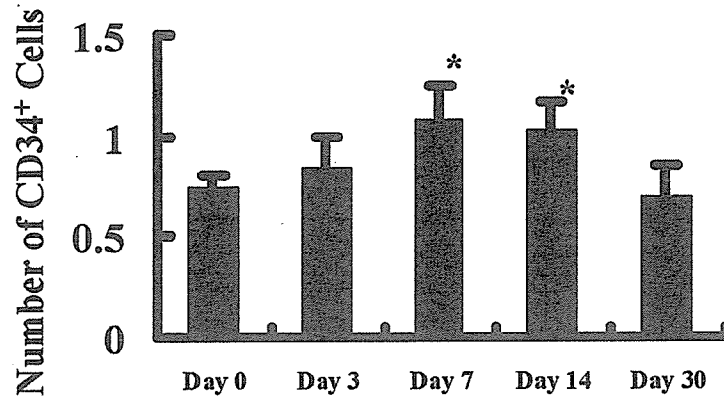


図 8 : 正常人における末梢血中
CD34陽性細胞と年齢の相関

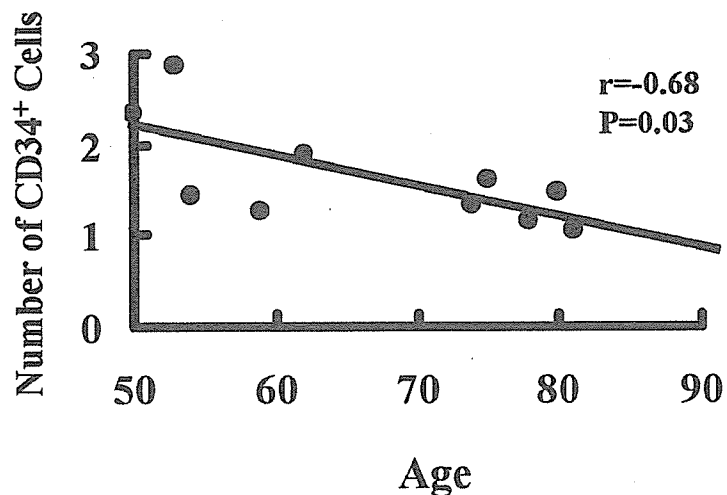


図 9 : 脳梗塞患者における末梢血中 CD34陽性細胞と年齢の関連

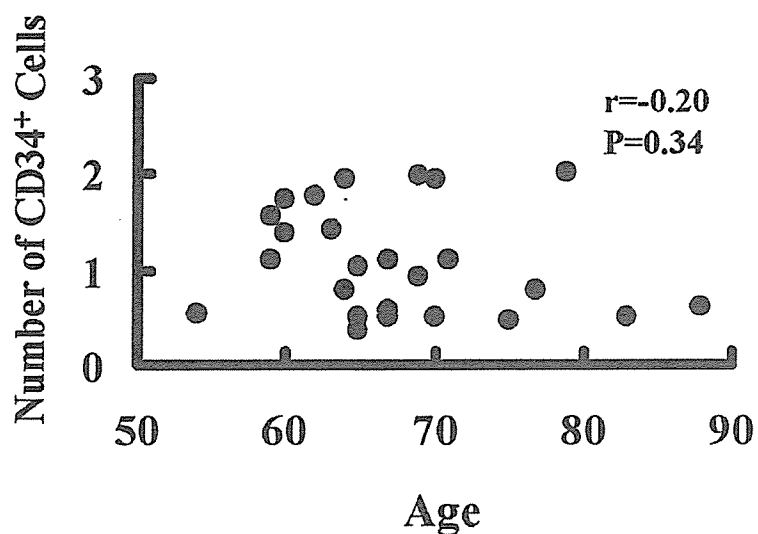


図 10 : 末梢血中幹細胞数と頸動脈動脈硬化性病変との関連

