

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調査している。

1. 末梢血中血管血球系幹細胞の定量的評価と神経機能評価との関連

i) 脳梗塞患者における認知症発症と末梢血中 CD34 陽性細胞の関連

DSM-III-R にて認知症有りと判定された慢性期脳梗塞患者群においては、認知症なしの群に比べ著明な末梢血中血管血球系幹細胞の減少が認められた。

ii) 脳梗塞患者における日常生活動作と末梢血中 CD34 陽性細胞の関連

脳梗塞患者において、Barthel Index (図 1) や modified Rankin Scale (図 2)、NIHSS (図 3) など脳梗塞による機能障害の程度と末梢血中血管血球系幹細胞数には有意な相関関係は観察されなかった。

iii) 脳梗塞患者における認知機能と末梢血中 CD34 陽性細胞の関連

MMSE や Clinical Dementia Rating により評価された脳梗塞後の認知機能と末梢血中血管血球系幹細胞との関連の検討を行った。その結果、MMSE (図 4、5) および CDR (図 6) の両者において、年齢因子補正後も末梢血中血管血球系幹細胞数の低下が認知機能低下と関連していることが明らかになった。

2. 認知症の病型分類と末梢血中 CD34 陽性細胞との関連

i) 量的検討

脳血管性認知症およびアルツハイマー型認知症患者、混合型認知症群における末梢血中血管血球系幹細胞の定量的評価においては、脳血管性認知症群で著明な低下を認めるものの、アルツハイマー型認知症患者群においては明らかな低下は認めなかった (図 7)。また混合型認知症群においては、低値～高値群までの分布を示しており、混合型認知症群における血管性因子の多様性を示しているものと考えている。

ii) 質的検討

末梢血中 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 (図 8)。健常人や脳血管障害患者群においては末梢血中血管内皮前駆細胞によるコロニー形成能は CD34 陽性細胞数とよく相関したが、アルツハイマー型認知症患者群においては相関がみられなかった (図 9)。また、その血管コロニー形成細胞は脆弱であり、血管血球系幹細胞の機能的変化が認知症病態の基盤に存在することが示唆された (図 10, 11)。これにより、末梢血中血管内皮前駆細胞によるコロニー形成能の測定が、認知症群における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する可能性があると考えている。

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や脳血液関門のメンテナンスを介して神経組織の代謝や機能にまで影響を与え、脳神経機能の維持に重要な機能を果たしていることを示唆するものであり、末梢血中血管血球系幹細胞減少を伴う認知機能患者に対する、新しい治療法の発展に繋がるものであると考えている。実際、マウス脳梗塞モデルを用いた動物実験では、脳梗塞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、アルツハイマー型認知症患者では末梢血中幹細胞数の増加が観察されるにもかかわらず血管内皮細胞形成機能はかならずしも保たれていないことから、アルツハイマー型認知症患者における脳機能低下の背景に血管血球系幹細胞の機能低下による血管性因子の関与が存在する可能性が示唆された。これらの結果を基礎に、今後の前向きコホート研究では認知症の病態解明や治療法の開発に直結する知見が得られると考えている。

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⁾、脳梗塞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⁾。本研究で得られた結果は、血管血球系幹細胞が認知症の病態と深く関わっていることを示すものであり、脳梗塞患者や認知症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。今後は血管血球系幹細胞に関する医療技術と総合することにより、脳梗塞患者や認知症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) Taguchi A, Matsuyama T, Soma T, et al. (2004) Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function. *Circulation* 109:2972-2975.
- 2) Taguchi A, Soma T, Nishimura H, Yoshikawa H, 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.

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Taguchi, A., Matsuyama, T., et al.	Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function.		Circulation			2004	109:297 2-2975
Taguchi, A. Soma, T., Matsuyama, T., et al.	Administration of CD34+ cells post-stroke enhances angiogenesis and neurogenesis in a murine model.		J. Clin. Invest.			2004	114: 330-389
松山知弘	脳卒中とその予後 (Post Stroke) —脳保護を目指した治療戦略—		日経メディカル9月号	日本経済新聞社		2005	170— 175

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
田口明彦、松山知弘	脳こうそく、血管幹細胞で神経再生	読売新聞	9月17日 夕刊	1	2004
田口明彦、松山知弘	脳こうそく、幹細胞不足再発要因か	読売新聞	2月2日 朝刊	3	2005

資料 1

脳血管性痴呆症および虚血性脳血管障害における末梢血幹細胞の研究 再生医療研究を目的とする血液の採取とその利用についてのお願い

研究の概要

血液の中に含まれている細胞（幹細胞：様々な細胞になることのできる細胞）が脳梗塞や心筋梗塞等の改善に関連している可能性があり、当病院ではそれらの細胞を使った、新しい予防法や治療法（再生医療）の実現を目的とした研究を行っております。

研究への協力について

あなた(または、提供者本人の代わりに同意の意思を決定されるあなた)に、この研究への協力をお願いするため説明を行います。

この研究への協力の同意はあなたの自由意志で決めてください。強制ではありませんし、また、この協力に同意しなくてもあなたの不利益になることは一切ありません。また、一旦同意した場合でもあなたは不利益を受けることなく、いつでもその同意を取り消すことができ、その場合は採取した血液は廃棄され、それ以降の研究目的に使用されることもありません。

研究目的

血液に含まれている細胞（幹細胞）が脳梗塞等の病気に関連している可能性が考えられています。脳梗塞の患者さん、および脳梗塞のない患者さんの血液を比較することにより、それらの細胞の持つ働きについて研究します。これらの研究を通じて、新しい予防法や治療法の開発ができると考えています。

研究方法

血液中の幹細胞は新しく血管を作ったり、血管を修復したりする能力がありますが、この研究ではこれらの能力と、病気や病状の関連について研究します。

具体的にはあなたの血液を採取させて頂き、その中に含まれる幹細胞等の量や質に関して検査を行うと共に、本来の治療に必要な検査結果（脳 CT 撮影など）との比較検討をします。これらの研究のため静脈あるいは点滴ルートより採血を 1 度行いますので、よろしくお願いいたします。

あなたにもたらされる利益および不利益について

本研究によりあなたに直接有益な情報をもたらす可能性は低いですが、解析が進めば病気に関する医学情報が進歩し、結果的に臨床上有益な情報が得られる可能性があります。また研究の成果は今後の医学の発展に寄与すると考えています。不利益は静脈血採取に伴う疼痛および血液の物理的損失がありますが、通常の採血と同じで採血量も少なくなるように配慮しています。

個人情報(プライバシー)の保護について

あなたの本研究に関する個人情報は、他の医療情報と同様に厳重に保護されます。

費用負担等について

この研究に係る費用については兵庫医科大学診療研究費等で負担します。また、当該研究により発生した知的財産権は、兵庫医科大学および研究者に帰属します。

担当医への連絡

この研究に関して問題点や分からないこと、心配なことなどがありましたら、いつでも御遠慮なく担当医に申し出てください。

平成 年 月 日

兵庫医科大学病院

担当医師（主治医） 氏名 _____

連絡先電話番号 0798-45-6596 （総合内科、神経・SCU科）

資料 2

脳血管性痴呆症および虚血性脳血管障害患者における末梢血幹細胞の研究への協力に関する同意書

兵庫医科大学病院 病院長 殿

私は、「脳血管性痴呆症および虚血性脳血管障害患者における末梢血幹細胞の研究」（主任研究者 芳川浩男）に関して、その目的、内容、利益及び不利益を含む下記の事項について担当者から説明文書を用いて説明を受け、理解しました。

また、同意した後であっても、いつでも同意を撤回できること、そのことによって何ら不利益を生じないこと、疑問があればいつでも質問できることについても説明を受け納得しました。

については、私自身の自由意思により研究への協力を同意いたします。

（御理解頂いた項目に を入れてください。）

- 研究の概要
- 研究への協力について
- 研究目的
- 研究方法（採血を1度行います）
- 私にもたらされる利益および不利益について
- 個人情報(プライバシー)の保護について
- 研究成果の公表について
- 費用負担等について
- 担当医への連絡

平成 年 月 日

氏名 _____

(署名または記名、押印)

(代理人の場合)

氏名 _____ (患者との関係 _____)

(署名または記名、押印)

住所 _____

電話番号 _____

() _____

資料 3

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"/> 時間に対しての障害あり。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して診断する)

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

改訂 長谷川式簡易知能評価スケール(HDS-R)			
■氏名		■生年月日 年 月 日	
■年齢		男・女 ■検査者	
No.	質問内容		配点
1	お年はいくつですか? (2年までの誤差は正解)		0 1
2	今日は何年の何月何日ですか? 何曜日ですか? (年、月、日、曜日が正解でそれぞれ1点ずつ)	年	0 1
		月	0 1
		日	0 1
		曜日	0 1
3	私たちが今いるところはどこですか? (自発的にできれば2点。5秒おいて、家ですか? 病院ですか? 施設ですか? の中から正しい選択をすれば1点)		0 1 2
4	これから言う3つの言葉を言ってみてください。あとでまた聞きますので良く覚えておいてください。(以下の系列のいずれか1つで、採用した系列に○印をつけておく)		0 1
	1: a) 桜 b) 猫 c) 電車 2: a) 梅 b) 犬 c) 自動車		0 1
5	100から7を順番に引いてください。 (100-7は? それからまた7を引くと? と質問する。最初の答えが不正解の場合、打ち切る)	(93)	0 1
		(86)	0 1
6	私がこれから言う数字を逆から言ってください。 (6-8-2、3-5-2-9を逆に言ってもらおう。3桁逆唱に失敗したら打ち切る)	2-8-6	0 1
		9-2-5-3	0 1
7	先ほど覚えてもらった言葉をもう一度言ってみてください。(自発的に回答があれば2点、もし回答がない場合、以下のヒントを与え正解であれば1点) a) 植物 b) 動物 c) 乗り物		a: 0 1 2 b: 0 1 2 c: 0 1 2
8	これから5つの品物を見せます。それを隠しますので、何があったか言ってください。(時計、鍵、たばこ、ペン、硬貨など必ず相互に無関係なもの)		0 1 2 3 4 5
9	知っている野菜の名前をできるだけ多く言ってください。(答えた野菜の名前を右欄に記入する。途中でつまり、約10秒間待っても答えない場合はそこで打ち切る) 0~5=0点、6=1点、7=2点 8=3点、9=4点、10=5点		0 1 2 3 4 5
合計得点			

カルテチェックシート

EPC study 登録者

症例番号	氏名	カルテ番号	身長	体重	チェック者		確認者	
臨床診断名:			検査値項目	検査値	検査日	検査値	検査日	
基礎疾患			AST(GOT)					
糖尿病			ALT(GPT)					
高血圧			ALP				MRI (有・無) 実施日	
高脂血症			γ-GTP					
喫煙			Cr					
虚血性心疾患			BUN					
四肢動脈閉塞症			空BS				CT (有・無) 実施日	
慢性動脈閉塞症			HbA1c					
腎機能障害			T-Ch					
介護保険利用			L-Ch					
飲酒			TG					
運動			TP				脳SPECT (有・無) 実施日	
他院の処方			Alb					
サプリメント・健康食品			Hb					
貧血			RBC					
			WBC				イベント回数	
			CRP					
当院処方 (処方日)			備考: 入退院時の痴呆評価、介護保険状況など					入退院歴
								眼底検査 (有・無) 実施日
								福田分類

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

〈イベント発症報告書〉

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 _____

発症回数 初回 2回目 3回目以上

発症イベント

①発症日：平成 年 月 日

②発症イベント

A. 脳血管障害

アテローム血栓性梗塞, ラクナ梗塞, 心原性脳塞栓, 奇異性脳塞栓症, 動脈解離による脳梗塞、TIA、その他の原因不明の脳梗塞、脳出血、くも膜下出血、その他： _____

B. 心血管障害

心筋梗塞、狭心症、その他： _____

C. その他の循環器障害

ASO、その他： _____

D. 死亡

死亡原因： _____

E. その他

悪性腫瘍の診断、重篤な肝機能障害、呼吸器疾患、血液疾患、消化器疾患の発症

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

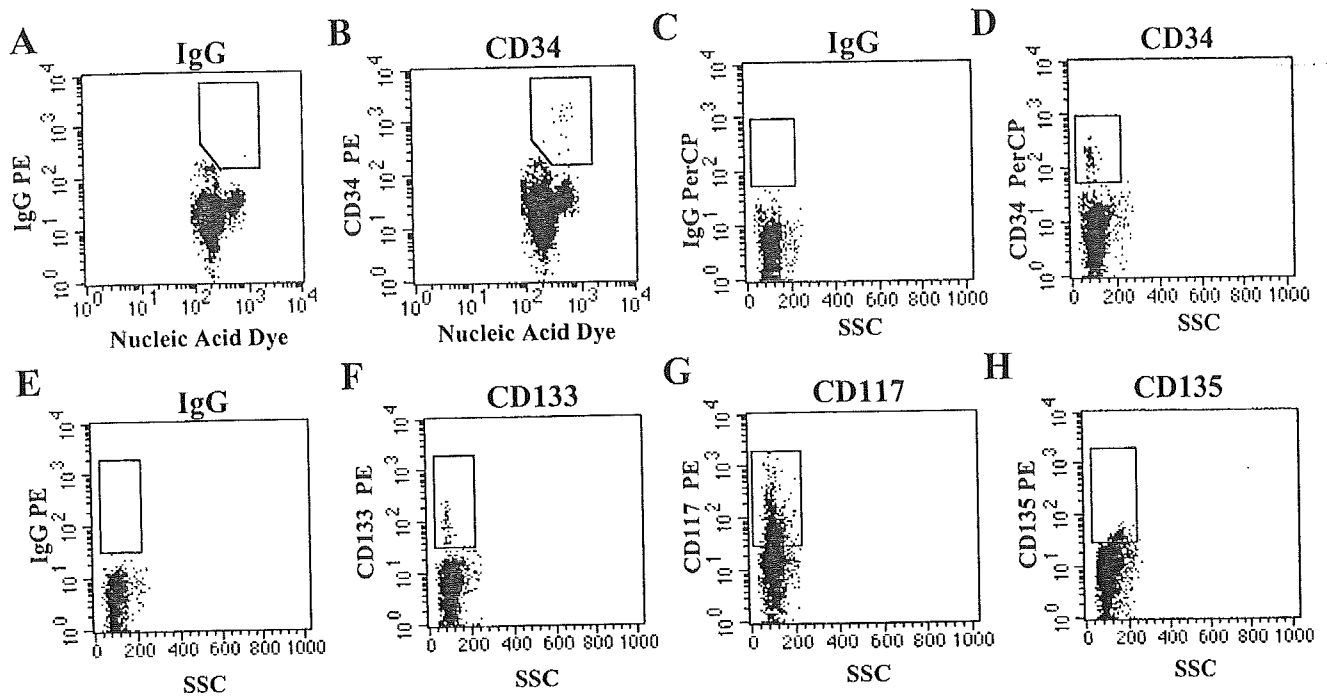


Figure 1. Quantification of circulating immature cells in patients with stroke. Nucleic acid dye versus CD34 PE dot plot was gated on lymphocytes and CD45 dim leukocytes. A, Results with an isotype-matched control antibody. B, Results with anti-CD34 antibody. Enriched immature mononuclear cells were 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,