

表6. ANCA持続陽性例とANCA陰性化例の患者背景

	ANCA持続陽性例	ANCA陰性化例	計
症例数 (例)	10	16	26
発症時年齢 (歳)	41.1±8.6	43.8±11.2	42.7±10.0
検査時年齢 (歳)	63.3±10.7	65.2±9.7	64.5±9.9
罹病期間 (年)	22.2±3.6	18.6±9.5	20.2±7.6
Stage			
I	0	2 (12.5%)	2 (7.7%)
II	0	0	0
III	8 (80.0%)	9 (56.3%)	17 (65.4%)
IV	2 (20.0%)	5 (31.3%)	7 (26.9%)
Class			
1	1 (10.0%)	4 (25.0%)	5 (19.2%)
2	4 (40.0%)	10 (62.5%)	14 (53.8%)
3	5 (50.0%)	2 (12.5%)	7 (26.9%)

表7. ANCA持続陽性例における臨床・検査所見の特徴 (持続陽性10例 vs 陰性16例)

発症時年齢	検査時年齢	罹病期間	Stage	Class	皮下結節	強膜炎	胸膜炎	肺臓炎	末梢神経炎	腎不全
ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

MRA	SJS	アミイト*	RAPA	ANA (pattern)	SS-A	赤沈	CRP	蛋白尿	血尿
ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	6/10 3/16	7/10 2/16
								p<0.05	p<0.01

## マウス皮膚由来血管内皮細胞株 F- 2 の樹立とその性状について

分担研究者：古川福実（和歌山県立医科大学皮膚科）

研究要旨：血管炎の病態形成には、血管内皮細胞が産生する種々の生理活性物質や接着分子の動的な発現が関与する可能性が考えられるが、血管内皮細胞の研究に際しては、材料に限りがあり、安定な細胞株がなかなか得られないという難点があった。共同研究者である戸田らが樹立した F-2 細胞株は、血管内皮としての細胞学的特徴を有し、血管内皮細胞の研究材料として貴重なものであると考えられる。

〔研究目的〕 マウスの皮膚に生じた腫瘍より細胞株を樹立し、その細胞学的性状を検討する。

〔研究方法〕 BALB/c x C57BL/6 F1 - nu/nu ノードマウスに 1 日 1 時間、週 3 回、27 週間、UVB を照射し、腫瘍を形成させた。マウスに生じた腫瘍から数種類の細胞株を樹立し、DMEM/10%FBS 培地で、細胞を維持した。 $10^5$ ~ $10^6$  の培養細胞をノードマウスに接種し、腫瘍形成の後、その組織学的所見を検討した。血管内皮細胞としての特徴を確認する目的で、通常のプレート上の培養の他、マトリゲル上での培養を行い、適宜、電子顕微鏡により観察した。蛍光物質 Dil を結合させた acetylated low density lipoprotein (Ac-LDL) を培養液中に添加して、細胞を 4 時間培養した後、蛍光顕微鏡による観察を行なった。また、ビオチンで標識した Griffonia simplicifolia I agglutinin (GSA-I) を培養細胞と 30 分間反応させた後、蛍光色素 FITC で標識したアビジンと 30 分間反応させ、蛍光顕微鏡で観察した。細胞が培養液中に産生する endothelin-1 (ET-1) および各種サイトカインの量を ELISA 法により測定した。DMEM/5%FBS 培地および fibroblast growth factor (FGF) 100ng/ml を添加した同培地で、細胞を 5 日間培養し、各々の細胞数を毎日カウントした。

[研究結果] BALB/c x C57BL/6 F1 - nu/nu ノードマウスに UVB を照射し、生じた腫瘍から数種類の細胞株を得た。その多くが、線維肉腫であったが、F-2 と名付けられた細胞株は、異なる特徴を有していた。すなわち、ノードマウスに F-2 を接種すると、接種部位に出血性の腫瘍が形成され、組織学的にも、数層の腫瘍細胞で被われ、血液を充満したのう腫が確認された。 in vitro の系では、confluent の状態で、敷石状の外観を呈していたが、マトリゲル上では、蜂巢状の構造を呈し、F-2 の細胞群が、索状構造により、連結していた。索状構造を呈する細胞間には、管腔構造が形成されているのが、電子顕微鏡で確認された。細胞質中に Weibel-Palade 小体は認められなかったが、37℃、血清無添加の培養条件下で、Ac-LDL の取り込みが示された。さらに、F-2 の GSA-I への顕著な結合が認められた。また、線維肉腫の細胞株は、ET-1 をほとんど産生していなかったが、F-2 は、およそ 200pg/10<sup>6</sup>cell の ET-1 を産生していると考えられた。サイトカインに関しては、ヒト臍帯静脈の細胞 (HUVEC) と同様、IL-1、IL-6、IL-8、G-CSF、GM-CSF の産生が認められた。培養液中への FGF 添加は細胞増殖速度に影響を与えず、F-2 は何らかの因子により、オートクリン様式で増殖する可能性が示唆された。

[考察] 研究により明らかとなった F-2 の特性を列挙する。

- 1) in vivo で血管腫様の病変を形成する。
- 2) 敷石状の外観を呈する。
- 3) マトリゲル上で管腔を形成する。
- 4) Ac-LDL を取り込む。
- 5) GSA-I が結合する。
- 6) ET-1 を産生する。
- 7) IL-1、IL-6、IL-8、G-CSF、GM-CSF を産生する。

[結論] F-2 は造腫瘍性を有する細胞株であると同時に、血管内皮細胞としての特徴を保持し、血管炎をはじめとする血管に由来する疾患の解析に有用であると考えられた。

# 全身性血管炎症候群におけるサイトメガロウイルス産生タンパク US27,

## US28 の発現検討

分担研究者： 津坂 憲政 埼玉医科大学総合医療センター第二内科 講師

研究要旨：近年、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) 感染が血管再建術後の血管狭窄や動脈硬化性病変を含む血管病変と関連することが指摘され、ことに血管平滑筋細胞に取り込まれた HCMV が発現する US27, US28 などのタンパクが様々なケモカインレセプターと相同性をもつために、ケモカインと結合して血管平滑筋細胞を遊走させることが病因の一つとして考えられている。そこで全身性血管炎症候群においてもこれら US27, US28 タンパク発現が関与するかどうかを検討した。US27・US28 cDNA をサイトメガロウイルス血症患者末梢血リンパ球より RT-PCR 法により増幅しこれを pCRII vector に組み込んだ。これを鋳型 DNA として *in vitro* transcription で US27・US28 sense, antisense RNA probe を生成し, *in situ* hybridization で HCMV 肺炎患者肺組織を検討したところ、US27・US28 antisense RNA probe によって HCMV 感染細胞が染色され、この系で組織中の US27, US28 タンパク発現を検討することができると考えられた。

### A. 研究目的

近年、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) 感染が血管再建術後の血管狭窄や動脈硬化性病変と関連することが指摘され、ことに血管平滑筋細胞に取り込まれた HCMV が発現する US27, US28 などの細胞表面タンパクが、Fractalkine receptor, CCR-1, CCR-3, CCR-4 などのケモカインレセプターと相同性をもつために、RANTES あるいは MCP-1 などの CC ケモカインと結合して血管平滑筋細胞を遊走させることが病因の一つとして考えられている<sup>1,2)</sup>。そこで全身性血管炎症候群における血管病変と HCMV との関連について検討することを目的とし、そのためにまず US27 および US28 mRNA をプローブとした *in situ* hybridization によって血管炎組織での US27 および US28 の発現を検討することを本年の目的とした。

### B. 研究方法

#### 1) PCR

末梢血より Ficoll 法を用いてリンパ球分画を抽出した。全 genomic DNA はリンパ球から DNA purification kit (Promega 社) を用いて抽出した。

US27 cDNA, US28 cDNA は、US27, US28 mRNA に特異的なプライマーを用いて PCR 法により増幅した。

#### 2) プローブの生成

Insert DNA は TA cloning Kit (STRATAGENE 社) を用いて pCRII vector に ligation を行い、BamHI あるいは XhoI で linear DNA とし、*in vitro* transcription の鋳型 DNA とした。Digoxigenin 標識 RNA プローブは、DIG RNA labeling kit (Boehringer Mannheim 社) を用いた。

#### 3) *In situ* hybridization

凍結切片は DEPC-PBS 中の 4% パラフォルムアルデヒドで 10 分間ポストフィックスし、0.1% の活性化 DEPC-PBS で 15 分間、2 回洗浄後、DEPC 処理 5x SSC で 15 分間平衡化した。Salmon sperm DNA を含む 50% フォルムアミド、5x SSC 中で 50°C で 2 時間、プレハイブリダイゼーションを行い、Salmon sperm DNA を含む 50% フォルムアミド、5x SSC 中で、400 ng/ml の DIG 標識プローブと 50°C 40 時間、ハイブリダイゼーションを行った。2x SSC 洗浄後、AP 標識抗 DIG 抗体と 2 時間反応

させ、さらに洗浄後BCIP/NBTを加え染色させ、とTE bufferで染色を停止させた。その後95%EtOH中で1時間静置し非特異的バックグラウンドを除去し、スライドへのマウントした。

### C. 研究結果

HCMV血症患者末梢血よりFicoll法を用いてリンパ球分画を抽出し、さらに全genomic DNAを精製した。次に、この全genomic DNAを鋳型DNAとしてUS27, US28 mRNAに特異的なプライマーを用いてPCR法によりUS27 cDNA, US28 cDNAをそれぞれ増幅した。次にこれらcDNAをpCRII vectorに組み込み、BamHIあるいはXhoIでlinear DNAとし、in vitro transcriptionの鋳型DNAとした(図1)。T7 RNA polymeraseあるいはSP6 RNA polymeraseを用いて、US27およびUS28のDigoxigenin標識senseならびにantisense RNA probeをin vitro transcriptionにより生成した。

次に、これらUS27ならびにUS28がHCMV感染症で発現されることをin situ hybridizationで確認した。組織は、サイトメガロウイルス肺炎患者の肺組織を用いた。その結果、US27およびUS28 antisense RNA probeで組織中のHCMV感染細胞が染色され、US27ならびにUS28が発現されていることが確認できた(図2)。なお、US27およびUS28 sense RNAでは染色されなかった。

### D. 結語

HCMV感染が血管炎症候群と関連するという報告はこれまでも散見された。しかしながら、血管炎症候群でUS27あるいはUS28などのHCMV発現タンパクが亢進するという報告はこれまでのところまだない。血管炎症候群患者でケモカイン産生が亢進する報告がこれまでいくつかされているため、ケモカインレセプターと相同性をもつUS27, US28タンパク発現を検討することは非常に意義深いと考えられた。そのために本年度われわれは、組織におけるUS27とUS28の発現をin situ hybridizationで検出する系を確立することができた。今後は、この系を用いて実際に血管炎症候群患者組織においてUS27とUS28発現を検討する予定である。

### E. 健康危険情報

特記すべきことなし。

### 【参考文献】

1. Streblow DN, Soderberg-Naucler C, Vieira J, Smith P, Wakabayashi E, Ruchti F, Mattison K, Altschuler Y, Nelson JA. The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration. *Cell*. 24: 511-20, 1999
2. Streblow DN, Orloff SL, Nelson JA. The HCMV chemokine receptor US28 is a potential target in vascular disease. *Curr Drug Targets Infect Disord* 1:151-8, 2001

### F. 研究発表

#### 1) 論文発表

##### 【原著】

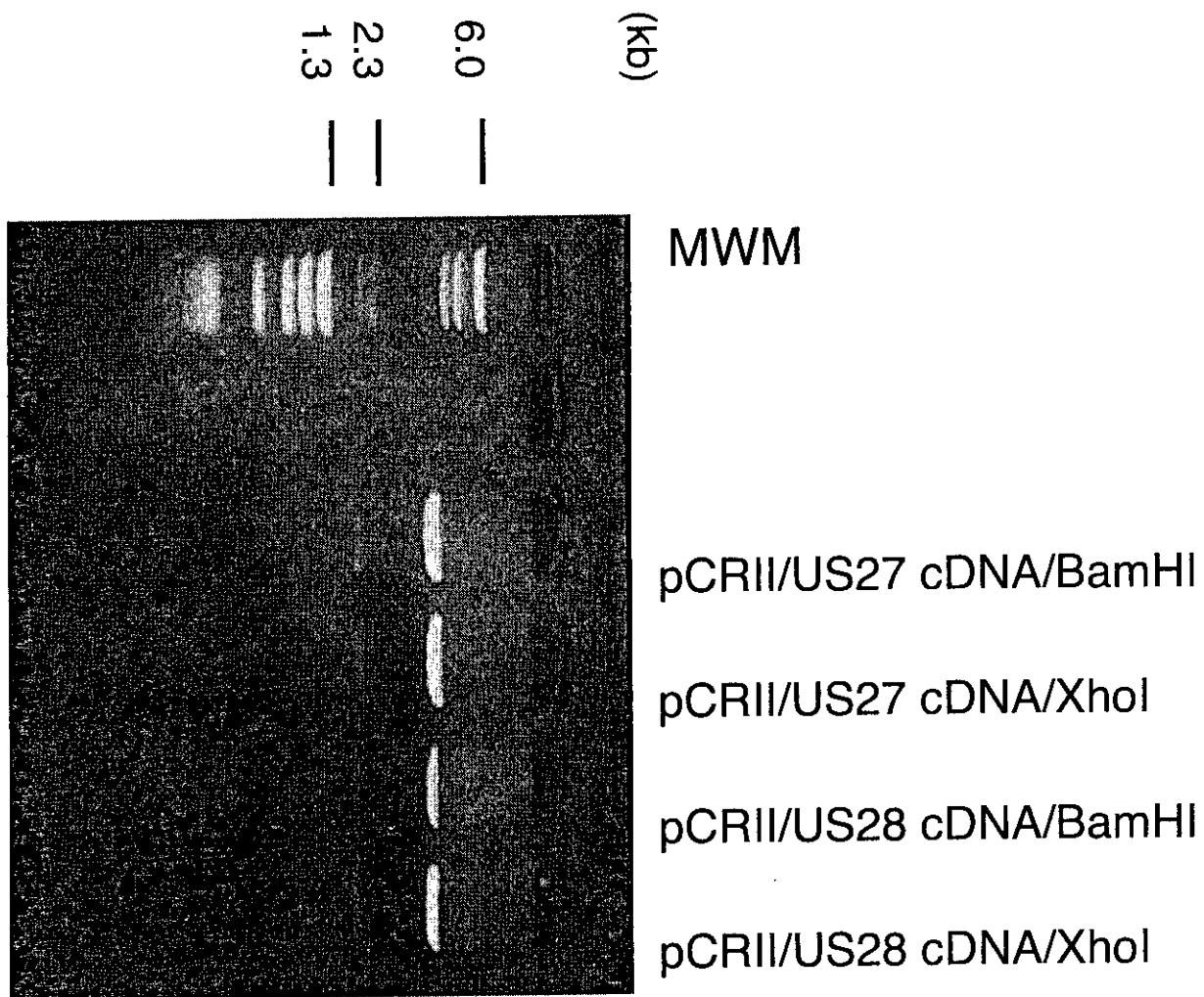
1. Tsuzaka K, Onoda N, Yoshimoto K, et al. *Mod Rheumatol* 12: 167-173, 2002
2. Pang M, Setoyama Y, Tsuzaka K, et al. *Clin Exp Immunol* 129: 160-168, 2002
3. Tsubota K, Fujita H, Tadano K, et al. *Clin Exp Immunol* 129: 177-182, 2002

##### 【学会発表】

1. Tsuzaka K, Shiraishi K, Tsubota K, et al. 8th International Symposium on Sjogren's syndrome. Kanazawa, Japan, May, 2002
2. Shiraishi K, Tsuzaka K, Tsubota K, et al. 8th International Symposium on Sjogren's syndrome. Kanazawa, Japan, May, 2002
3. Tsuzaka K, Fukuhara I, Setoyama Y, et al. ACR 66th Annual Meeting, New Orleans, U. S. A., October, 2002
4. Tsuzaka K, Shiraishi K, Tsubota K, et al. ACR 66th Annual Meeting, New Orleans, U. S. A., October, 2002
5. Yoshimoto K, Nudejima M, Setoyama, et al. ACR 66th Annual Meeting, New Orleans,

U. S. A. , October, 2002

- G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）  
特記すべきことなし。





US28



US27



## 図表の説明文

- 図1. 鑄型 DNA となる US27, US28 cDNA の作製。HCMV 血症患者末梢血リンパ球より RT-PCR 法で US27 cDNA, US28 cDNA をそれぞれ増幅し、pCRII vector に組み込み、BamHI あるいは XhoI で linear DNA とし、in vitro transcription の鑄型 DNA とした。
- 図2. In situ hybridization 法による HCMV 肺炎患者肺組織での US27-US28 タンパクの発現検討。US27, US28 antisense RNA probe を用いた in situ hybridization で US27-US28 タンパク発現が認められた(矢印)。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

難治性血管炎に関する調査研究

分担研究報告書

難治性 ANCA 関連血管炎に対する標準的治療法の確立と前向き臨床試験の立ち上げ

分担研究者： 山田 秀裕

聖マリアンナ医科大学内科学（リウマチ・膠原病・アレルギー-内科） 助教授

研究要旨

我が国における難治性血管炎に対する治療法は、施設間、専門医間で異なっており、その根拠は極めて乏しい。難治性血管炎の治療に関する EBM を確立するために以下の行動計画を立てた。1) 過去の業績と欧米で得られた根拠に基づいて、現時点で最良と考えられる治療プロトコールを作成する。2) その治療法の有用性を確認するための多施設共同前向き臨床試験を立ち上げる。3) その治療法を対照として新しい実験的治療法の有用性を比較するランダム化比較対照試験を企画、実施する。初年度は、1) および 2) に関する試案を作成した。前向き臨床試験の対象患者は一つ以上の重要臓器障害をみとめる ANCA 関連血管炎患者とした。除外基準として悪性腫瘍・重篤な感染症、妊娠、20 歳未満・80 歳以上、文書合意の得られない患者等を設定。標準的治療法としてプレドニゾロン 1mg/kg 連日とシクロホスファミド 0.5g/mm<sup>2</sup> 間歇静注療法の併用とした。プレドニゾロンは 2ヶ月以内に 20mg/日以下に漸減する。日和見感染症対策として一定のプロトコールを設定した。エンドポイントは生死、寛解、重篤な感染症、重要臓器障害 (VDI) とした。今後、多施設専門医間で合意が得られ次第、各施設の倫理委員会の承認を得、前向き臨床試験を開始する。

A. 研究目的 難治性 ANCA 関連血管炎に対する治療法とその予後に関する EBM を確立するため、現時点で最良と考えられる標準的治療法を設定する。さらにその治療法を対照とした多施設共同長期前向き比較対照臨床試験を立ち上げる。

B. 方法 前向き臨床試験をデザインする上で必要な臨床的根拠を、我が国および欧米で行われた臨床研究の解析結果を利用した。この際に、科学的根拠に乏しいアンケート調査や後ろ向き調査報告は参考程度にとどめ、前向き臨床試験、ランダム化対照試験 (RCT) またはそれらを集積したメ

タ分析の結果を根拠のある研究成果として採用した。

C. 結果 我が国から報告された血管炎に関する臨床研究の中で、根拠のある研究報告は皆無であった。前向き臨床試験のすべては欧州の血管炎研究グループ (EUVAS) によるものであり、米国では進行中の研究が 1 つあった。EUVAS の研究成績をまとめると、ANCA 関連血管炎の予後は、疾患による差よりも重要臓器障害の有無によって左右され、ステロイド大量単独療法よりシクロホスファミド併用療法、特にシクロホスファミド間歇静注療法が寛解導入率お

よび安全性に優れていた。また、日和見感染症の予防が生命予後を左右する重要な要因であった。

以上の解析結果および文献的根拠をもとにして、難治性血管炎に対する標準的治療法の有用性を検討する前向き臨床試験を以下のようにデザインした。対象患者は、ANCA 関連血管炎患者で重要臓器（中枢神経、心筋、肺、腸管、腎）のうち1つ以上の障害を有する患者とする。悪性腫瘍、感染症合併例は除外する。標準的治療法は、シクロホスファミド 0.5g/mm<sup>2</sup> の4週ごとの間歇静注とプレドニゾン 1mg/kg の連日投与の併用療法とした。シクロホスファミドの投与量は70歳以上で半減し、腎機能に応じて減量する。4週毎に6ヶ月間投与し、以後3ヶ月毎に計2年間継続投与する。プレドニゾンは2ヶ月以内に20mg/日以下まで漸減する。日和見感染症対策として一定のプロトコールを定める。1ヶ月ごとにBVAS、3ヶ月ごとにVDIおよびSF36の評価を行い、BVAS=0となった時点を寛解導入時点とし、その後BVAS=2以上となった時点を再燃とする。評価項目は、死亡、寛解導入、再燃、寛解維持期間、臓器障害 (VDI)、QOL (SF-36) とする。目標症例は20症例とする。臨床試験は参加各施設の倫理委員会の承認のもと、患者から文書同意を得て行う。

#### D. 考察

医療の実践において根拠を求める昨今の風潮は、従来の経験主義的医療の弊害から脱却する上で好ましい傾向である。血管炎などの稀少疾患においては、根拠を確立することは困難を極める。しかし、情報化社会の恩恵を生かすことにより、多施設共同臨床試験を立ち上げることができれば、稀少疾患といえどもエビデンスを確立することは可能である。すでに欧州においては1994年以来、多施設共同の前向き臨床試験が数多く立ち上げられ、1998年以降、優れたエビデンスが提供されてきた。しか

るに、我が国の血管炎に関する研究を振り返ってみるに、すべては retrospective な調査であり、前向きのランダム化対照試験は皆無である。さらに、もっとも大規模な研究が行われた厚生省の研究班による臨床研究においては、もっとも安易かつ信憑性に欠けるアンケート調査が主流を占めていたことは、驚きを通り越して愕然とするほかはない。そろそろ我が国においても前向き臨床試験を立ち上げて、血管炎に関するエビデンスを確立していかないと、医療に関して二流国家に陥落するのではないかと危惧される。我が国における医学に関する基礎研究レベルは世界のトップクラスといえるかもしれないが、いざ臨床医学となると世界に発信できる優れた臨床研究は稀である。この責任の多くは、厚生労働省の研究班が、文部省が行うような基礎研究に予算を配分し、質の高い臨床研究を推進してこなかったことにあると考える。前向き臨床試験を遂行するには、倫理的・経済的多くの問題が内在しており、このことが、これまでの研究者が臨床試験をためらう要因となってきたと考えられる。今後は、厚生労働省自らが、前向き臨床試験を強力に推進すべく、環境整備すべきである。さらに、研究班は質の高い臨床試験を立ち上げるべく、果敢に努力すべきと考える。

本研究は、我が国初の前向き臨床試験を企画し、近い将来に質の高いRCTを遂行するための予備試験と位置づけられるものである。

血管炎のような稀少疾患を対象とする前向き臨床試験を我が国で遂行し、質の高いエビデンスを確立するためには、以下の作業が必要と考えられる。1) 現時点で多くの専門医が合意できる標準的治療法と診療プロトコールの作成、2) 標準的治療法を対照として試験的治療法のデザイン、3) 患者 outcome を中心とした評価方法とエンドポイントの設定、4) 全国的な診療ネットワークの形成と全患者の登録シス

テムの確立。5) 予算の確保。今年度の研究は上記の1)～3)について試案を作成し研究班の合意を得る事を目指した。今後は、さらに多くの専門施設に参加を要請し、血管炎の診療ネットワークの構築を目指す。かかる前向き臨床試験のもう一つの意義は、治療開始前に保存された血清などの患者試料を用いて、治療反応性や予後などを規定する因子の解析を可能にする。

E. 結論 ANCA 関連血管炎に対する EBM を確立するため、重症 ANCA 関連血管炎の定義と標準的治療法のプロトコールを作成した。

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

Skin perfusion pressureを用いたBuerger病の肢虚血重症度評価

兼高武仁（東京大学大学院血管外科学分野）

重松 宏（東京大学大学院血管外科学分野）

宮田哲郎（東京大学大学院血管外科学分野）

新本春夫（東京大学大学院血管外科学分野）

小見山高士（東京大学大学院血管外科学分野）

小野塚温子（東京大学大学院血管外科学分野）

研究要旨：Buerger 病は末梢動静脈の閉塞により，四肢の虚血症状を呈する疾患であるが，ankle pressure (AP)は病状を正確に反映しない場合がある．Buerger 病患者の quality of life は潰瘍，壊死等の皮膚病変に左右されることから，皮膚灌流圧(SPP; skin perfusion pressure)測定に着目し，閉塞性動脈硬化症症例との比較検討を，患肢の第1趾のSPPとAPを用いて行った．前年度の研究では，Buerger 病症例7例9肢において経過中の病勢あるいは病変の進行を客観的に評価しうる指標となる可能性が示唆された．これを踏まえ症例数の追加を行い，前年度の結論を再検討した．

Buerger 病症例 27 例 35 肢，糖尿病を除いた閉塞性動脈硬化症症例 20 例 35 肢の検討では，SPP と AP の相関係数は Buerger 病で  $R^2=0.187$ ，ASO で  $R^2=0.78$  で，ASO 症例でより高い相関関係が得られた．Buerger 病では AP が高値であっても SPP が低値を示す症例が ASO よりも多く認められた．Buerger 病症例を足部の潰瘍の有無で 2 群に分けると，AP は 2 群間で差を認めなかったのに対し，SPP は潰瘍のある群で有意に低かった ( $P=0.005$ )．これらは Buerger 病の末梢血管病変を反映したものと考えられ，Buerger 病における SPP の有用性を示唆するものと考えられた．

## A. 研究目的

Buerger 病は末梢動静脈が血管炎により閉塞を来し、四肢末梢部に虚血症状を呈する疾患である<sup>1)</sup>。本症では中枢側の動脈に明らかな病変を認めないことも多く、現在一般的に行われている、AP などの非侵襲的評価法では測定結果と臨床症状とが必ずしも合致しない症例を経験する場合もあり、臨床的重症度を反映しうる新たな客観的検査法の確立が求められている。皮膚灌流圧は以前より血管外科領域に置いて臨床応用されてきたが<sup>2)</sup>、近年の測定機器および検査手技の改良によって当初より簡便に皮膚組織の灌流状態を測定することが可能になってきている<sup>3)</sup>。一方、Buerger 病患者における QOL は、潰瘍、壊死等の皮膚症状そのものに大きく影響されると考えられる<sup>4)</sup>。昨年我々は Buerger 病症例 7 例 9 肢において SPP が経過中の病勢あるいは病変の進行を客観的に評価しうる指標となる可能性があることを報告した。これを踏まえ症例数の追加を行い、前年度の結論を再検討した。

## B. 研究方法

2001 年 1 月から 2002 年 12 月までに当科を受診した Buerger 病症例 27 例 35 肢（男性 25 例，女性 2 例，平均年齢 60.7 歳）を対象とした。また代表

的な末梢動脈疾患として、糖尿病合併例を除く閉塞性動脈硬化症症例 20 例 35 肢（男性 17 例，女性 3 例，平均年齢 71.3 歳）においても同様の測定を行い、Buerger 病症例と比較検討した。SPP の測定には Vasamedics 社製の Laser Dopp PV-2000 を用い、室温 25 度の検査室で、被検者を仰臥位で安静臥床とした後に、患肢の第 1 趾で測定を行った。また、その他の指標として AP を全例で測定し、SPP と AP の相関関係および両指標と臨床症状との関連について検討した。

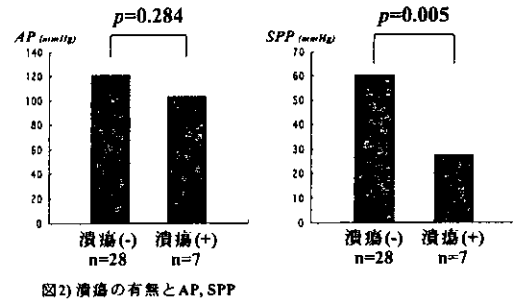
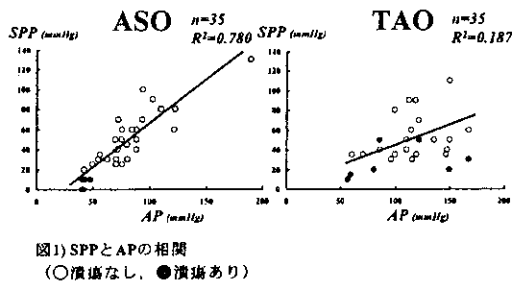
## C. 研究結果

SPP と AP の相関係数は Buerger 病で  $R^2=0.187$ 、ASO で  $R^2=0.78$  であり、ASO 症例においてより高い相関関係が得られた。Buerger 病では AP が高値であるにもかかわらず SPP が低値を示す症例が ASO よりも多く認められた（図 1）。

また、Buerger 病症例を足部の潰瘍の有無で 2 群に分けると、AP は 2 群間で有意差を認めなかったのに対し、SPP は潰瘍のある群で有意に低い値を示した ( $P=0.005$ )（図 2）。

## D. 考察

皮膚灌流圧は皮膚虚血の指標とし



て1977にHolstein<sup>2)</sup>がRadionuclide Washout法により測定したのが始まりである。測定部位に放射性物質を皮下注射したのち、カフを加減圧し、放射線をカウントすることにより測定されたが、手技が煩雑で測定に時間を要し、患者負担が大きい点が問題であった。Laser Doppler法は1992年に非侵襲的な検査法としてMalvezzi<sup>3)</sup>が報告した。これはlaser光のDoppler効果を利用して、血管内を移動する赤血球を感知することにより局所のSPPを測定する方法であるが、Radionuclide Washout法と同等の検査結果が得られるうえ、測定時間が大幅に短縮され、患者負担も軽減した。

Buerger病は末梢動静脈が血管炎により閉塞を来し、間歇性跛行、潰瘍、壊死などのさまざまな下肢虚血症状を呈する疾患であるが、その原因はいまだ不明である。ASOがFontaine分類の1度から4度へと順に症状が進行するのに対し、Buerger病では、潰瘍や壊死が初発症状であることも頻繁に見受けられ<sup>5)</sup>、従来の

病期分類を単純にあてはめることができない点が本症の客観的な重症度評価を困難にしている原因のひとつであると考えられる。今回の検討では、下肢末梢における皮膚虚血の程度がBuerger病の臨床的重症度に関与する重要な要素となりうるのではないかとの観点から足趾SPPの測定を行った。その結果、中枢側に血管病変を有するASOではAPとSPPがよい相関を示したのに対し、Buerger病では両指標の相関関係は弱く、足関節部の血流と足趾の皮膚灌流との間にばらつきがみられた。Buerger病では足関節より末梢部に病変を有する症例も多く、今回の結果はSPPがAPよりも足趾の病態を正確に反映しうることを示しているものと考えられた。臨床症状の相違によりSPPに群間で有意差がみられ、SPPがBuerger病における経過中の病勢あるいは病変の進行を客観的に評価しうる指標として適当であると考えられる。



E. 結論

SPP 測定は Buerger 病の病態を的確に把握するうえで、有用な情報を提供しうる非侵襲的検査法のひとつであると考えられた。

1. Buerger L: Thromboangitis obliterans: A study of the vascular lesions leading to presenile spontaneous gangrene. Am J Med Sci 136:567-580, 1908
2. Holstein P: Skin perfusion pressure measured as the external pressure required to stop isotope washout. Scand J Clin Lab Invest 37:649-659, 1977
3. Malvezzi L: The correlation between three methods of skin perfusion pressure measurement: Radionuclide washout, laser Doppler flow. And photoplethysmography. J Vasc Surg 15:823-830, 1992
4. 松尾汎: バージャー病患者の長期予後と Quality of Life に関する検討. 脈管学 37:883-886, 1997
5. Olin JW: The changing clinical spectrum of thromboangitis obliterans (Buerger's disease). Circulation 82(Suppl IV):IV-3-IV-8, 1990

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

難治性血管炎に関する調査研究

分担研究者 高野 照夫（日本医科大学第1内科 教授）

研究要旨：

心血管難治性疾患(慢性末梢動脈閉塞症・重症狭心症)に対して自己骨髄幹細胞による血管再生治療を11例に臨床応用し良好な結果を得た。さらに tissue engineering の手法を活用して徐放性増殖因子(b-FGF)を作製し、イヌ心筋梗塞モデル及びラット慢性下肢動脈閉塞モデルにおいても血管再生に成功した。

A. 研究目的

難治性血管炎の新しい治療法開発のため自己骨髄幹細胞移植による血管再生治療及び DDS 徐放化増殖因子による血管再生治療法を確立する。

B. 研究方法

難治性末梢動脈閉塞症に対する重症度別血管再生療法：年齢，原疾患，全身状態，検査所見等を総合判定して，①自己骨髄幹細胞移植による血管再生療法②ゼラチンマイクロスフェア徐放化 b-FGF 筋肉内注入血管再生療法，の有効性評価及び多変量解析を行う。

(倫理面への配慮) 大学と付属病院の2つの倫理委員会承認を得て，2回以上の説明を施行し，小委員会により適応評価を行った。

C. 研究成果

自己骨髄幹細胞移植による血管再生療法：11例の臨床応用を実施し，いずれの症例でも visual analogue scale(VAS) の大幅な改善が認められ，潰瘍の治癒，99m-TC tetrafosmin scintigraphy, DSA 等でも著明な改善が認めら

れた。②ゼラチンマイクロスフェア徐放化 b-FGF 筋肉内注入血管再生療法：LAD イヌ心筋梗塞モデルで術後31%に低下した EF が，4週後に68%に増加し，血管再生像も確認された。ラット慢性下肢動脈閉塞モデルにおいても Laser Doppler 血流計で対側健肢と同等の血流に復した。

D. 考察

臨床例においても①自己骨髄幹細胞移植による血管再生療法の有効性が証明された。現在この成果により本治療法を厚生労働省に高度先進医療に申請中である。②ゼラチンマイクロスフェア徐放化 b-FGF 筋肉内注入血管再生療法も有効性が確認され，臨床実施についても日本医科大学倫理委員会の承認を得た。現在連続した製剤の無菌チェックを実施中である。

E. 結論

われわれの自己骨髄幹細胞移植による血管再生療法及びゼラチンマイクロスフェア徐放化 b-FGF 筋肉内注入血管再生療法血管再生療

法としては有効であり，臨床応用実施中であり，また臨床応用可能である。

#### F. 健康危険情報

術後発赤，軽度の浮腫を生じた症例が3例認められたが，自然に治癒し，重篤，長期に及ぶものは認められなかった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

宮本正章他：重症難治性糖尿病性壊疽に対する自己骨髄幹細胞浸透人工真皮を用いた血管再生細胞治療 Complication, in press

##### 2. 学会発表

Masaaki Miyamoto et.al: Therapeutic

angiogenesis for patients with refractory Peripheral ischemic disease by autologous implantation of bone-marrow mononuclear cells. 6<sup>th</sup> International Congress of the Cell Transplant 92,2003

宮本正章 他：難治性末梢血管疾患に対する自己骨髄幹細胞による血管再生療法の有用性 第2回日本再生医療学会総会 2, 351 2002

#### H. 知的財産権の出願

##### 1. 特許出願

発明人：宮本正章

特願 2002-190161, 生物由来材料の消化・細胞回収方法及びその装置

分担研究報告書

難治性血管炎に関する調査研究に関する研究

分担研究者 森下 竜一 大阪大学医学系研究科 遺伝子治療学 助教授

研究要旨

難治性血管疾患であるバージャー病に対して、遺伝子プラスミドによる血管新生療法の安全性・有用性を臨床研究において検討する。現在分担研究者が行っている遺伝子治療臨床研究において良好な結果が得られており、本研究班でさらに症例数を増やした他施設臨床研究を **double-blinded study** として予定している。本研究は臨床研究にとどまらず、さいしゅうてきには HGF 遺伝子プラスミド製剤の薬剤開発を目指す。

分担研究者 森下 竜一  
大阪大学医学系研究科 遺伝子  
治療学  
助教授

A. 研究目的

末梢性血管疾患に対する遺伝子プラスミドを用いた血管新生療法の安全性・有用性を検討する。

B. 研究方法

分担研究者は大阪大学で「末梢性血管疾患に対する HGF 遺伝子プラスミドを用いた遺伝子治療臨床研究」(TREAT-HGF; Japan Trial to Treat Peripheral Arterial Disease by Therapeutic Angiogenesis Using Hepatocyte Growth Factor Gene Transfer) をバージャー病 8 症例に対

して実施した。本臨床研究では、血管新生因子 HGF の **naked plasmid** の筋注による遺伝子導入を行い、安全性・有効性を観察する。さらに本研究班で症例数を増やした **double-blinded study** を複数施設にて実施するためのプロトコールを作製する。TREAT-HGF は厚生労働省の遺伝子治療ガイドラインを遵守しており、また同意取得文書において患者の人権・プライバシーなどの倫理的配慮を行っている。この妥当性は厚生労働省・文部科学省により確認されており、その指導のもとに実施されている。

C. 研究結果

TREAT-HGF において 22 症例（閉塞性動脈硬化症 14 例・バージャー病 8 例）に対して遺伝子治療が実施され