

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

低出力体外衝撃波を用いた閉塞性動脈硬化症に対する  
非侵襲性血管新生療法の開発に関する研究

平成 15 年度 総括研究報告書

主任研究者 下川 宏明

平成 16 (2004) 年 4 月

## 目次

- |      |   |          |
|------|---|----------|
| I.   | 総括研究報告書   | 1-4 ページ  |
|      | 低出力体外衝撃波を用いた閉塞性動脈硬化症に対する<br>非侵襲性血管新生療法の開発に関する研究<br>下川宏明 |          |
| II.  | 研究成果の刊行に関する一覧表  | 5 ページ    |
| III. | 研究成果の刊行物・別刷   | 6-10 ページ |

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
総括研究報告書

低出力体外衝撃波を用いた閉塞性動脈硬化症に対する  
非侵襲性血管新生療法の開発に関する研究

主任研究者 下川宏明 九州大学大学院医学研究院循環器内科学・助教授

### 研究要旨

本研究は、低出力の体外衝撃波を用いて重症の四肢の閉塞性動脈硬化症に対する非侵襲性血管新生療法を開発するものである。低出力体外衝撃波を用いた血管新生療法は、重症の狭心症患者に対して既に九州大学病院で実施中であり、その有効性・安全性が確認されつつあり、重症の四肢虚血に対しても十分にその効果が期待できる。本研究は、我々がこれまで行ってきた重症心筋虚血に対する体外衝撃波療法の基礎的および臨床的研究実績に基づき、その治療効果を重症の四肢虚血に適応しようとするものであり、極めて実現性が高い。また、実現すれば、世界初の虚血四肢に対する非侵襲的血管新生療法の開発となる。

実際の研究は3年間で行い、平成15・16年度は基礎的検討（家兎における慢性下肢虚血モデルでの検討）を中心に行い、平成17年度にかけて臨床応用を目指した臨床研究を計画している。基礎的及び臨床的研究とも主として研究代表者の下川が実施し、分担研究者の前原は血管外科学の立場から基礎的・臨床的研究を補助し、松田は医用工学の立場から血流計測を補助する。現在、九州大学には下川がスイスの衝撃波治療機器メーカーであるストルツ社と共同で開発した血管新生療法専用の治療機器が2台あり（1台は基礎研究用、1台は臨床治療用）、本研究でもこれらの機器を用いる。

本治療法の利点は、麻酔や外科的侵襲なしに体外から任意の虚血部位に効率的に血管新生を惹起できること、患者には痛みなどの苦痛を全く与えないこと、急性期・慢性期の副作用がないこと、必要ならば（外来でも）繰り返し実施できること、医療費が大幅に節減できること、などである。

本治療法は、未曾有の高齢化社会を迎えようとしている我が国で増加中の四肢の閉塞性動脈硬化症に、非侵襲的で安全かつ効果的な血管新生療法を提供することになり、国民の保健医療の向上や医療費の大幅な削減により国家の保健財政にも大きく貢献することが期待される。

### 分担研究者氏名・所属施設名および所属施設における職名

前原喜彦 九州大学大学院医学研究院総合外科学・教授

松田武久 九州大学大学院医学研究院医用工学・教授

### A. 研究目的

我が国では、人口の高齢化や生活の欧米化などにより、虚血性心臓病・脳卒中・閉塞性動脈

硬化症などの動脈硬化性疾患が増加している。

これらの動脈硬化性疾患は、国民の生命予後を悪化させ、日常生活のQOLを著しく低下させ、活力のある社会の実現に大きな障害となっている。これらの動脈硬化性疾患に対しては、これまで、薬物療法・カテーテル療法・バイパス手術などが行われてきたが、最近では、これらの治療法だけでは十分な治療効果が得られない重症の狭心症や下肢の閉塞性動脈硬化症の症例が増えてきている。これに対して、自家細胞移植や遺伝子導入を用いた血管再生療法が開発され、

その一部は試験的に臨床応用され始めているが、これらの先端的血管新生療法は、その安全性が十分には確認されておらず、また侵襲的であり何回も繰り返し実施することは実際上不可能である。我々は、後述するように、低出力の衝撃波が血管内皮細胞から各種の血管新生因子の産生を促進するという研究結果に着目し、体外から心臓に衝撃波を照射することにより、動物(ブタ)モデルにおいて高度の心筋虚血を完全に回復させるほどの著明な血管新生を誘導することに成功した(論文投稿中)。副作用も全く認められなかった。この実験結果を基に、平成14年12月の九州大学医学部倫理委員会での承認を受けて、重症狭心症患者に対する非侵襲性の体外式心臓血管新生療法を開始し、虚血心筋の血流が改善し自覚症状が著明に改善するなどの良好な結果を得ている。これを受けて、国立循環器病センターの参加を得て、より大規模な臨床治験を開始すべく現在準備中である。この画期的な体外式血管新生療法は、麻酔や手術操作が一切不要なこと、必要ならば繰り返し実施可能であること、副作用がないこと、医療費が大幅に削減できること、など多くの特徴がある。本研究では、閉塞性動脈硬化症による重症下肢虚血に対する非侵襲性の体外式血管新生療法の開発を目指す。

## B. 研究方法

本研究は閉塞性動脈硬化症による重症下肢虚血に対する非侵襲性の体外式血管新生療法の臨床応用を目指し、以下の基礎研究、臨床研究を行う。

### (1) ヒト培養血管内皮細胞における検討

血管内皮に対する衝撃波の血管新生作用を確認するために、 $1 \times 10^5$  個の細胞に様々なエネルギーレベルの衝撃波を照射し、VEGF, bFGF, angiopoietin などの血管新生因子およびそれらの受容体の遺伝子発現を検討する。

### (2) ウサギ下肢虚血モデルにおける検討

本研究では、下肢が衝撃波を照射できるのに

十分な大きさがある家兎を用いる。

### i. 重度下肢虚血モデルにおける効果

ウサギの左大腿動脈近位部から遠位部まで、結紮後切除し、片側重度下肢虚血モデル(Takeshita S, et al. J. Clin. Invest. 1993)を作成する。本モデルは、虚血領域から重度の慢性動脈閉塞症患者に相当する。その後、同虚血部に衝撃波治療(200発/1ヶ所 20~30ヶ所)を計3~6回施行し、4週間後に下肢動脈の血管造影検査、血圧測定、血流の測定を行う。

### ii. 軽度下肢虚血モデルにおける効果

ウサギの両側の両後肢において膝窩動脈、伏在動脈を結紮し、中筋枝のみを温存することで poor runoff モデルを作成した。poor runoff モデル(Itoh H, et al. Atherosclerosis 1994)は、急性虚血モデルと異なり慢性動脈閉塞症の血行動態に極めて類似している。作成後1年においても低血流量、低シエラストレスの血行動態を維持しており、非常に安定したモデルとして確立しており、比較的軽度の閉塞性動脈硬化症患者に相当する。結紮後2週間目から、片側に衝撃波治療(200発/1ヶ所、20~30ヶ所)を施行し、レーザードップラー法およびトランジット血流計をもちいて治療側と未治療側の血流を評価し、治療効果を検討する。

### (3) 臨床研究による検討

動物実験の結果を受けて、九州大学医学部倫理委員会の承認を得た後に、臨床研究を開始する。対象は、Fontane 分類の Class III または IV の重症患者とし、十分な生活習慣の改善が投薬療法によっても改善が得られず、また、バイパス手術やバルーン治療の適応がない患者とする。重症狭心症患者の治療条件と同様に、レベル3の低出力衝撃波を30~100ヶ所、1ヶ所当たり200発照射する。照射域は、治療機器に内蔵したエコーにより得られる画像により、容易に設定できる。これまでの検討の結果、最も衝撃波の効果を受ける範囲は  $2 \times 2$  mm の領域、

治療効果が得られる領域は 1 x 1 cm であること、また、骨を避ければ痛みも全く生じないことも確認している。この衝撃波治療を隔日に計 3 回行う。治療後、4 週間・12 週間目に治療を行った下肢の血流の程度を、レーザードップラー法およびサーモグラフィ法で評価する。また、両側下肢静脈からの採血、および承諾が得られた症例では下肢の筋肉の生検を行い、上記の血管新生因子の発現について検討を加える。

(倫理面での配慮)

動物実験では、動物愛護に十分配慮し、九州大学動物実験審査委員会の審査を受ける。臨床研究においては、九州大学医学部倫理委員会の審査を受けて、承認後、実施する。

### C. 研究結果および考察

#### (1) ヒト培養血管内皮細胞における検討

VEGF, Flt-1 は血管新生において重要な働きをもつことが知られており、すでにこの血管新生因子を用いた臨床応用が始まっている。今回の検討では、ヒト培養血管内皮細胞に対して、低出力の衝撃波エネルギーレベル (0.05 mJ/mm<sup>2</sup>) VEGF とその受容体である Flt-1 の mRNA レベルの発現亢進が認められた。

#### (2) ウサギ下肢虚血モデルにおける検討

##### i. 重度下肢虚血モデルにおける効果

衝撃波治療により、患側の下肢血圧/正常下肢血圧の比および血管造影上確認できる血管数の増加を認める傾向にある。

##### ii. 軽度下肢虚血モデルにおける効果

レーザードップラー法、トランジット血流計において、衝撃波治療側の下肢が、未治療側と比べ血流の改善傾向を示している。

これらの結果は、衝撃波治療が新生側副血管の再生を亢進させて、下肢の血流を改善させることを示唆している。今後も実験標本数を増やし、効果を統計学的に示すとともに、虚血筋肉中の毛細血管数、様々な血管新生因子について

検討する予定である。

### D. 結論

ヒト培養血管内皮細胞において、衝撃波治療が血管新生因子である VEGF とその受容体である Flt-1 の発現を亢進させ、血管新生を惹起する可能性が示唆された。ウサギ下肢虚血モデルを用いた動物実験では、現在までに衝撃波治療により側副血行路の増加傾向および血流の改善傾向が示されており、血管新生作用により閉塞性動脈硬化症などの虚血性疾患に対する有効な治療法となる可能性が示唆された。

### E. 健康危険情報

とくになし。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

Nishida T, et al. Extracorporeal cardiac shock wave therapy induces a complete recovery of ischemia-induced myocardial dysfunction in pigs in vivo. (Circulation, in revision)

#### 2. 学会発表

(1) Nishida T, et al. Extracorporeal cardiac shock wave therapy induces a complete recovery of ischemia-induced myocardial dysfunction in pigs in vivo. (American Heart Association Scientific Sessions, Nov 10, 2003, Orlando, Florida, USA. )

(2) Uwatoku T, et al. Extracorporeal cardiac shock wave therapy prevents left ventricular remodeling after myocardial infarction in a swine model. (第68回日本循環器学会総会 平成16年3月27日 東京)

(3) Fukumoto Y, et al. Extracorporeal cardiac shock wave therapy ameliorates myocardial ischemia in patients with severe coronary artery disease. (第68回日本循環器学会総会 平成16年3月27日 東京)

G. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）  
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nishida et al.	Extracorporeal cardiac shock wave therapy induces a complete recovery of ischemia-induced myocardial dysfunction in pigs in vivo.	Circulation	in revision		
伊藤 昭 下川宏明	重症虚血性心疾患に対する体外衝撃波治療法の開発	臨床と研究	81	59-63	2004

20030389

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。