

200400081B

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～16年度 総合研究報告書

主任研究者 下川 宏明

平成17年(2005)年 4月

目次

- | | | |
|------|----------------|----------|
| I. | 総合研究報告書 | 1-5 ページ |
| II. | 研究成果の刊行に関する一覧表 | 6 ページ |
| III. | 研究成果の刊行物・別刷 | 7-21 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）
総合研究報告書

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、その治療効果を重症の四肢虚血に適応しようとすることを目的とした。

本研究では、平成15・16年度は基礎的検討（培養細胞や家兎における慢性下肢虚血モデルでの検討）を中心に行った。低出力体外衝撃波治療は、VEGFやFlt-1等の血管新生因子の発現を亢進させ（ヒト培養血管内皮細胞）、ウサギ重度下肢虚血モデルおよび軽度下肢虚血モデルにおいて、衝撃波治療群で有意な虚血肢の血流改善と毛細血管数の増加を認めた。また、副作用は認めなかった。これらの結果から、低出力体外衝撃波治療が四肢の閉塞性動脈硬化症にたいして、有効かつ安全性の高い治療法となりうる可能性が示唆された。今後平成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。

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(Nishida, Shimokawa, et al. *Circulation*. 110: 3055-3061, 2004.)。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、平成17年度からの高度先進医療への申請を準備中である。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、 1×10^5 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, Flt-1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もちいる。

1) 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、広範な虚血領域が惹起され、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(0.09 mJ/mm^2 , 200発/1ヶ所, 20~30ヶ所)を計3回施行し、4週間後に下肢動脈の血管造影検査、血圧測定、トランジット血流計をもちいた血流の測定および組織学的検討を行う。

2) 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(Itoh H et al. *Atherosclerosis* 1994)を作成した。この poor runoff モデルは、急性虚血モデルと異なり、作成後1年においても低血流量、低シエア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3日目

から、片側に衝撃波治療 (0.09 mJ/mm², 200 発/1ヶ所, 20~30ヶ所) を計12回を施行し、5週間後にレーザードップラー法およびトランジット血流計を用いて、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 (0.09 mJ/mm²) 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 2×2mm の領域、治療効果が得られる領域は 1×1cm 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週間間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て、受理された。今後の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、実施する予定である。

C. 研究結果

(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、既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 (0.09 mJ/mm²) を照射したところ、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

1) 重度下肢虚血モデルにおける効果

衝撃波治療群で、血圧比 (患側肢/正常肢) および総腸骨動脈の血流比 (患側肢/正常肢) の有意な増加を認めた。血管造影検査においては可視できる側副血管の増加は有意でなかったが、血流の改善、毛細血管数の増加を認めた。

2) 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による皮膚血流比 (右肢/左肢) は、衝撃波治療側の下肢で約 20% の有意な血流増加を認めた。また、トランジット血流計による動脈血流測定では、浅大腿動脈においては約半数の症例で対照肢と比較し血流増加を認めた。総腸骨動脈においては約 50% の血流増加を認めた。

3) 臨床研究による検討

上記した臨床試験を開始するために、現在、九州大学医学部倫理委員会へ申請する準備中である。

D. 考察

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 の発現を増加させ、血管新生を亢進させる可能性が示唆された。また、ウサギ下肢虚血モデルを用いた検討では、衝撃波治療により虚血下肢の血流改善および毛細血管数の増加を認め、血管新生作用による治療効果が示唆された。

E. 結論

体外衝撃波治療は閉塞性動脈硬化症などの虚血性疾患に対する有効かつ安全性の高い治療法となる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

(1) 国内

口頭発表	15件
原著論文による発表	2件
それ以外（レビュー等）の発表	1件
そのうち主なもの	

国内論文発表

- ・重症虚血性心疾患に対する体外衝撃波治療法。福本義弘（治療 86: 2185-2188, 2004）
- ・次世代低侵襲性医療の開発。下川宏明。（福岡医学雑誌 95 (10):264-268, 2004）

国内学会発表

- ・ **Extracorporeal cardiac shock wave therapy improves blood flow in a rabbit model of mild hindlimb ischemia.** 大井啓司（第69回日本循環器学会総会 平成17年3月19日、横浜）
- ・ **Extracorporeal cardiac shock wave therapy ameliorates severe hindlimb ischemia in rabbits.** 大井啓司（第69回日本循環器学会総会 平成17年3月19日、横浜）
- ・ **Extracorporeal cardiac shock wave therapy suppresses left ventricular remodeling after myocardial infarction in pigs.** 上徳豊和（第69回日本循環器学会総会 平成17年3月20日、横浜）
- ・ **Extracorporeal cardiac shock wave therapy prevents left ventricular remodeling after myocardial infarction in a swine model.** 上徳豊和。（第68回日本循環器学会総会 平成16年3月27日、東京）
- ・ **Extracorporeal cardiac shock wave therapy ameliorates myocardial ischemia in patients with severe coronary artery disease.** 福本義弘（第68回日本循環器学会総会 平成16年3月27日、東京）
- ・ 遺伝子治療、体外衝撃波治療による血管新生療法の開発と血行再建後療法としての展開。松本拓也。（日本外科学会 平成16年4月7-9日、大阪）

- ・ 低出力体外衝撃波を用いた重症虚血性心疾患に対する非侵襲性血管新生療法の開発。上徳豊和。（第36回日本動脈硬化学会学術総会 平成16年7月23-24日2004年、福岡）
- ・ 低出力体外衝撃波を用いた重症虚血性心臓病に対する非侵襲性血管新生療法の開発 —基礎的検討— 大井啓司。

- ・ 急性心筋梗塞後の左室リモデリングに対する非侵襲性体外式衝撃波治療の開発。上徳豊和。（第52回日本心臓病学会学術集会 平成16年9月13-15日2004年、京都）

(2) 海外

口頭発表	3件
原著論文による発表	2件（うち1件はreview中）
それ以外（レビュー等）の発表	0件
そのうち主なもの	

海外論文発表

- ・ **Extracorporeal cardiac shock wave therapy reduces a complete recovery of ischemia-induced myocardial dysfunction in pigs in vivo.** Nishida et al. (Circulation. 2004; 110: 3055-3061.)
- ・ **Extracorporeal cardiac shock wave therapy ameliorates myocardial ischemia in patients with severe coronary artery disease.** Fukumoto et al. (Circulation 投稿中)

海外学会発表

- ・ **Extracorporeal cardiac shock wave therapy induces a complete recovery of ischemia-induced myocardial dysfunction in pigs in vivo.** Takahiro Nishida. (American Heart Association Scientific Sessions 2003 November 9-12, 2003, Orlando, USA)
- ・ **Extracorporeal shock wave therapy induces a complete recovery of ischemia-induced myocardial dysfunction in a pig model.** Hiroaki Shimokawa.

(European Society of Cardiology Congress 2004 August
28-September 1, 2004, Munich, Germany)

- **Extracorporeal cardiac shock wave therapy ameliorates myocardial ischemia in patients with severe coronary artery disease.** Yoshihiro Fukumoto.
(American Heart Association Scientific Sessions 2004
November 7-10, 2004, New Orleans, USA)

H. 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

書籍

著者氏名	論文タイトル	編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

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, Shimokawa, et al.	Extracorporeal cardiac shock wave therapy induces a complete recovery of ischemia-induced myocardial dysfunction in pigs in vivo.	Circulation	110 (19)	3055-61	2004
Fukumoto, Shimokawa, et al.	Extracorporeal cardiac shock wave therapy ameliorates myocardial ischemia in patients with severe coronary artery disease	Circulation (投稿中)			
福本義弘、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.	治療	86	2185-2188	2004
下川宏明	次世代低侵襲性医療の開発.	福岡医学雑誌	95 (10)	264-268	2004

Extracorporeal Cardiac Shock Wave Therapy Markedly Ameliorates Ischemia-Induced Myocardial Dysfunction in Pigs in Vivo

Takahiro Nishida, MD; Hiroaki Shimokawa, MD; Keiji Oi, MD; Hideki Tatewaki, MD; Toyokazu Uwatoku, MD; Kohtaro Abe, MD; Yasuharu Matsumoto, MD; Noriyoshi Kajihara, MD; Masataka Eto, MD; Takehisa Matsuda, PhD; Hisataka Yasui, MD; Akira Takeshita, MD; Kenji Sunagawa, MD

Background—Prognosis of ischemic cardiomyopathy still remains poor because of the lack of effective treatments. To develop a noninvasive therapy for the disorder, we examined the in vitro and vivo effects of extracorporeal shock wave (SW) that could enhance angiogenesis.

Methods and Results—SW treatment applied to cultured human umbilical vein endothelial cells significantly upregulated mRNA expression of vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in vitro. A porcine model of chronic myocardial ischemia was made by placing an ameroid constrictor at the proximal segment of the left circumflex coronary artery, which gradually induced a total occlusion of the artery with sustained myocardial dysfunction but without myocardial infarction in 4 weeks. Thereafter, extracorporeal SW therapy to the ischemic myocardial region (200 shots/spot for 9 spots at 0.09 mJ/mm^2) was performed ($n=8$), which induced a complete recovery of left ventricular ejection fraction ($51\pm 2\%$ to $62\pm 2\%$), wall thickening fraction ($13\pm 3\%$ to $30\pm 3\%$), and regional myocardial blood flow (1.0 ± 0.2 to $1.4\pm 0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) of the ischemic region in 4 weeks (all $P<0.01$). By contrast, animals that did not receive the therapy ($n=8$) had sustained myocardial dysfunction (left ventricular ejection fraction, $48\pm 3\%$ to $48\pm 1\%$; wall thickening fraction, $13\pm 2\%$ to $9\pm 2\%$) and regional myocardial blood flow (1.0 ± 0.3 to $0.6\pm 0.1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$). Neither arrhythmias nor other complications were observed during or after the treatment. SW treatment of the ischemic myocardium significantly upregulated vascular endothelial growth factor expression in vivo.

Conclusions—These results suggest that extracorporeal cardiac SW therapy is an effective and noninvasive therapeutic strategy for ischemic heart disease. (*Circulation*. 2004;110:3055-3061.)

Key Words: angiogenesis ■ contractility ■ hibernation ■ ischemia ■ regional blood flow

Prognosis of ischemic cardiomyopathy without an indication for coronary intervention or coronary artery bypass grafting still remains poor because medication is the only therapy to treat the disorder.¹ Thus, it is imperative that an effective and noninvasive therapy for ischemic cardiomyopathy be developed. Although no medication or procedure used clinically has shown efficacy in replacing myocardial scar with functioning contractile tissue, it could be possible to improve the contractility of the hibernating myocardium by inducing angiogenesis.

It recently has been suggested that shock wave (SW) could enhance angiogenesis in vitro.² SW is a longitudinal acoustic wave, traveling with the speed in water of ultrasound through body tissue. It is a single pressure pulse with a short needle-like positive spike $<1 \mu\text{s}$ in duration and up to 100 MPa in amplitude, followed by a tensile part of several

microseconds with lower amplitude.³ SW is known to exert the “cavitation effect” (a micrometer-sized violent collapse of bubbles inside and outside the cells)³ and recently has been demonstrated to induce localized stress on cell membranes that resembles shear stress.⁴ If SW-induced angiogenesis could be reproduced in vivo, it would provide a unique opportunity to develop a new angiogenic therapy that would not require invasive procedures such as open-chest surgery or catheter intervention. Therefore, the present study was designed to examine the possible beneficial effects of SW on ischemia-induced myocardial dysfunction in a porcine model of chronic myocardial ischemia in vivo.

Methods

This study was reviewed by the Committee on Ethics in Animal Experiments of Kyushu University and was carried out under the

Received May 5, 2003; de novo received June 2, 2004; accepted June 17, 2004.

From the Departments of Cardiovascular Surgery (T.N., H.T., N.K., M.E., H.Y.), Cardiovascular Medicine (K.O., H.S., T.U., K.A., Y.M., A.T., K.S.), and Biomedical Engineering (T.M.), and the 21st Century COE Program on Lifestyle-Related Diseases (H.S., T.M.), Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, Fukuoka, Japan.

Correspondence to Hiroaki Shimokawa, MD, PhD, Department of Cardiovascular Medicine, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan. E-mail shimo@cardiol.med.kyushu-u.ac.jp

© 2004 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at <http://www.circulationaha.org>

DOI: 10.1161/01.CIR.0000148849.51177.97

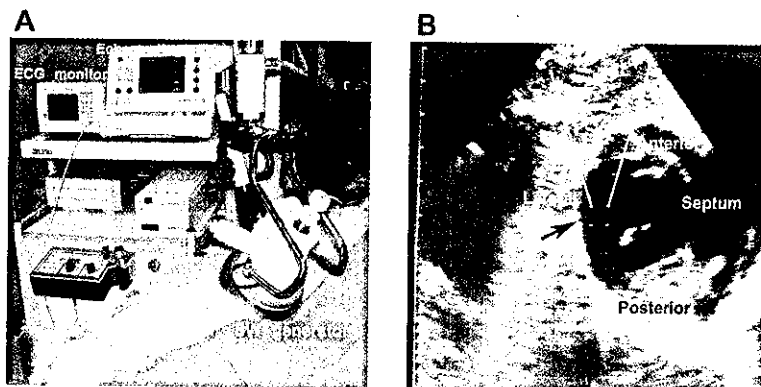


Figure 1. Extracorporeal cardiac SW therapy in action in a pig chronically instrumented with an ameroid constrictor. A, The machine is equipped with a SW generator and in-line echocardiography. The SW generator is attached to the chest wall when used. B, The SW pulse is easily focused on the ischemic myocardium under the guidance of echocardiography (black arrow).

Guidelines for Animal Experiments of Kyushu University and the Law (No. 105) and Notification (No. 6) of the Japanese Government.

Effect of SW on Human Umbilical Vein Endothelial Cells in Vitro

We purchased single-donor human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) (Clonetics, Walkersville, Md) and cultured them in a complete endothelial medium (EBM-2 BulletKit, Clonetics). HUVECs were subcultured and used at passages 3 to 5 and were maintained in EBM-2. Twenty-four hours before the SW treatment, HUVECs (1×10^5) were resuspended in a 2-mL tube with EBM (Clonetics). We treated the HUVECs with 500 shots of SW at 4 different energy levels (0 [control], 0.02, 0.09, 0.18, and 0.35 mJ/mm^2) and stored them for 24 hours in the same medium before RNA extraction.

Ribonuclease Protection Assay

We analyzed equal amounts of mRNA by ribonuclease protection assay by means of the RiboQuant multiprobe template (PharMingen). Briefly, we hybridized RNA overnight with a ^{32}P -labeled RNA probe, which previously had been synthesized from the template set. We digested single-stranded RNA and free probe by ribonuclease A and T1. We then analyzed protected RNA on a 5% denaturing polyacrylamide gel. We analyzed several angiogenic factors, including vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor, *fms*-like tyrosine kinase (Flt)-1, and angiopoietin and its receptor, tie-1, either by means of an NIH image or by means of autoradiography and subsequent quantification by densitometry (Alpha Innotech). For quantification, we normalized the signals for each sample of the blot with the corresponding signals of the housekeeping genes GAPDH and L32.

Porcine Model of Chronic Myocardial Ischemia

A total of 28 domestic pigs (25 to 30 kg in body weight) were used in this study. We anesthetized the animals with ketamine (15 mg/kg IM) and maintained anesthesia with an inhalation of 1.5% isoflurane for implantation of an ameroid constrictor, SW treatment, and euthanization. We opened the chest, suspended the pericardium and the left atrial appendage, revealed the left circumflex coronary artery (LCx), and put an ameroid constrictor around the proximal LCx to gradually induce a total occlusion of the artery in 4 weeks without causing myocardial infarction.^{5,6} We also confirmed histologically that no myocardial necrosis had developed in the present porcine model (data not shown). This model is widely used to examine the effect of an angiogenic therapy in the ischemic hibernating myocardium.^{5,6}

Extracorporeal Cardiac SW Therapy to Chronic Ischemic Myocardium

On the basis of the *in vitro* experiment, we applied a low energy of SW (0.09 mJ/mm^2 , $\approx 10\%$ of the energy for the lithotripsy treatment) to 9 spots in the ischemic region (200 shots/spot) with the guidance of an echocardiogram equipped within a specially designed

SW generator (Storz Medical AG) (Figure 1A). We were able to focus SW in any part of the heart under the guidance of echocardiography (Figure 1B). We applied SW to the ischemic myocardium in an R-wave-triggered manner to avoid ventricular arrhythmias. We performed the SW treatment ($n=8$) at 4 weeks after the implantation of an ameroid constrictor 3 times within 1 week, whereas animals in the control group ($n=8$) received the same anesthesia procedures 3 times a week but without the SW treatment. Because the SW treatment only requires the gentle compression of the generator to the chest wall, it is unlikely that this handling itself enhances angiogenesis in the ischemic myocardium.

Coronary Angiography and Left Ventriculography

After systemic heparinization (10 000 U/body), we performed coronary angiography and left ventriculography in a left oblique view with the use of a cineangiography system (Toshiba Medical). We semiquantitatively evaluated the extent of collateral flow to the LCx by the graded Rentrop score (0, no visible collateral vessels; 1, faint filling of side branches of the main epicardial vessel without filling the main vessel; 2, partial filling of the main epicardial vessel; 3, complete filling of the main vessel).⁷ We also counted the number of visible coronary arteries in the LCx region. To compare the extent of collateral development at a given time, we selected the frame in which the whole left anterior descending coronary artery was first visualized.

Echocardiographic Evaluation

We performed epicardial echocardiographic studies at ameroid implantation (baseline) and at 4 and 8 weeks after the implantation of the constrictor (Sonos 5500, Agilent Technology). We calculated wall thickening fraction (WTF) by using the following formula: $\text{WTF} = 100 \times (\text{end-systolic wall thickness} - \text{end-diastolic wall thickness}) / \text{end-diastolic wall thickness}$. We measured WTF when pigs were sedated, with and without dobutamine loading (15 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). Dobutamine was infused continuously from the ear vein, and WTF was measured after the hemodynamic condition was stabilized (in ≈ 5 minutes).

Measurement of Regional Myocardial Blood Flow

We evaluated regional myocardial blood flow (RMBF) with colored microspheres (Dye-Trak, Triton Technology) at ameroid implantation (baseline) and at 4 and 8 weeks after implantation.⁸ We injected microspheres through the left atrium and aspirated a reference arterial blood sample from the descending aorta at a constant rate of 20 mL/min for 60 seconds using a withdrawal pump. We extracted microspheres from the left ventricular (LV) wall and blood samples by potassium hydroxide digestion, extracted the dyes from the spheres with dimethylformamide (200 μL), and determined their concentrations by spectrophotometry.⁸ We calculated myocardial blood flow ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) of the endocardial and epicardial lateral LV wall (the LCx region).

Analysis of Cardiac Enzymes

We measured serum concentrations of cardiac troponin T and creatinine kinase (CK)-MB by using chemiluminescence immuno-

assay before the SW treatment and at 4, 5 (2 hours after the SW treatment), and 8 weeks after ameroid implantation.

Factor VIII Staining

We treated paraffin-embedded sections with a rabbit anti-factor VIII antibody (N1505, Dako, Copenhagen, Denmark). We counted the number of factor VIII-positive cells in the endocardial and epicardial wall in 10 fields of the LCx region in each heart at 400× magnification.

Real-Time Polymerase Chain Reaction

To examine the effect of SW treatment on the ischemic myocardium in vivo, the animals with an ameroid constrictor were euthanized 1 week after the SW treatment. Total RNA was isolated from rapidly frozen ischemic LV wall (LCx region) after 3 SW treatments and was reverse transcribed. Quantification of VEGF and its receptor Flt-1 was performed by amplification of cDNA with an ABI Prism 7000 real-time thermocycler.

Western Blot Analysis for VEGF

We performed Western blot analysis for VEGF. Western blot analysis for VEGF was performed with and without 3 SW treatments. Three sections from the ischemic LV wall (LCx region) were measured. The regions containing VEGF proteins were visualized by electrochemiluminescence Western blotting luminal reagent (Santa Cruz Biotechnology). The extent of the VEGF was normalized by that of β-actin.

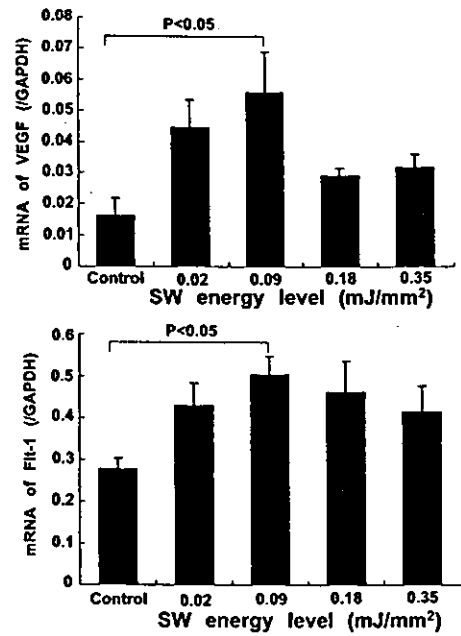


Figure 2. SW treatment upregulated mRNA expression of VEGF (A) and Flt-1 (B) in HUVECs in vitro with a maximum effect noted at 0.09 mJ/mm². Results are expressed as mean±SEM (n=10 each).

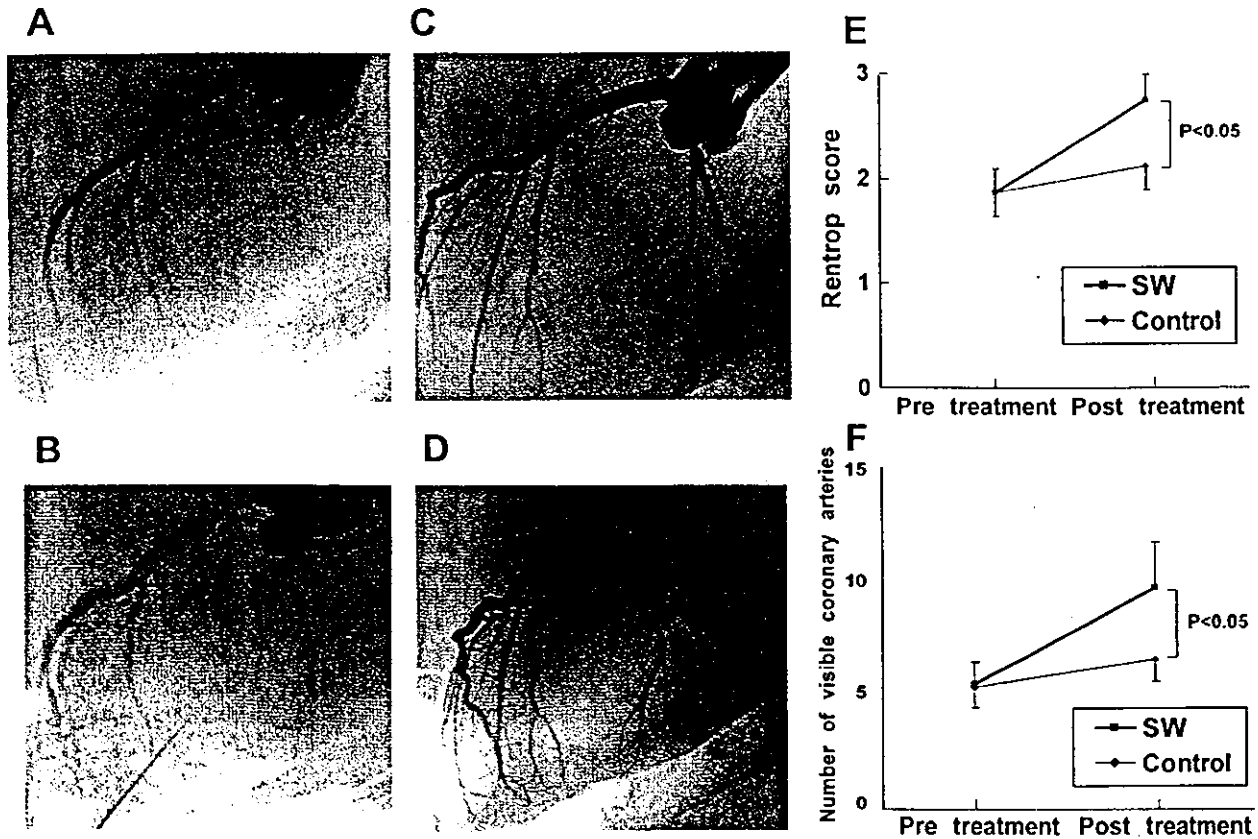


Figure 3. Extracorporeal cardiac SW therapy enhances coronary angiogenesis in vivo. A and C, Four weeks after the implantation of an ameroid constrictor, LCx was totally occluded and was perfused via collateral vessels with severe delay in both the control group (A) and the SW group (before SW therapy) (C). B and D, Four weeks after the first coronary angiography, no significant change in coronary vessels was noted in the control group (B), whereas a marked development of visible coronary vessels was noted in the SW group (D). E and F, Four weeks after the first coronary angiography, no significant increase in the Rentrop score (E) or visible coronary arteries from LCx (F) was noted in the control group, whereas increased Rentrop score and a marked development of visible coronary vessels were noted in the SW group. Results are expressed as mean±SEM (n=8 each).

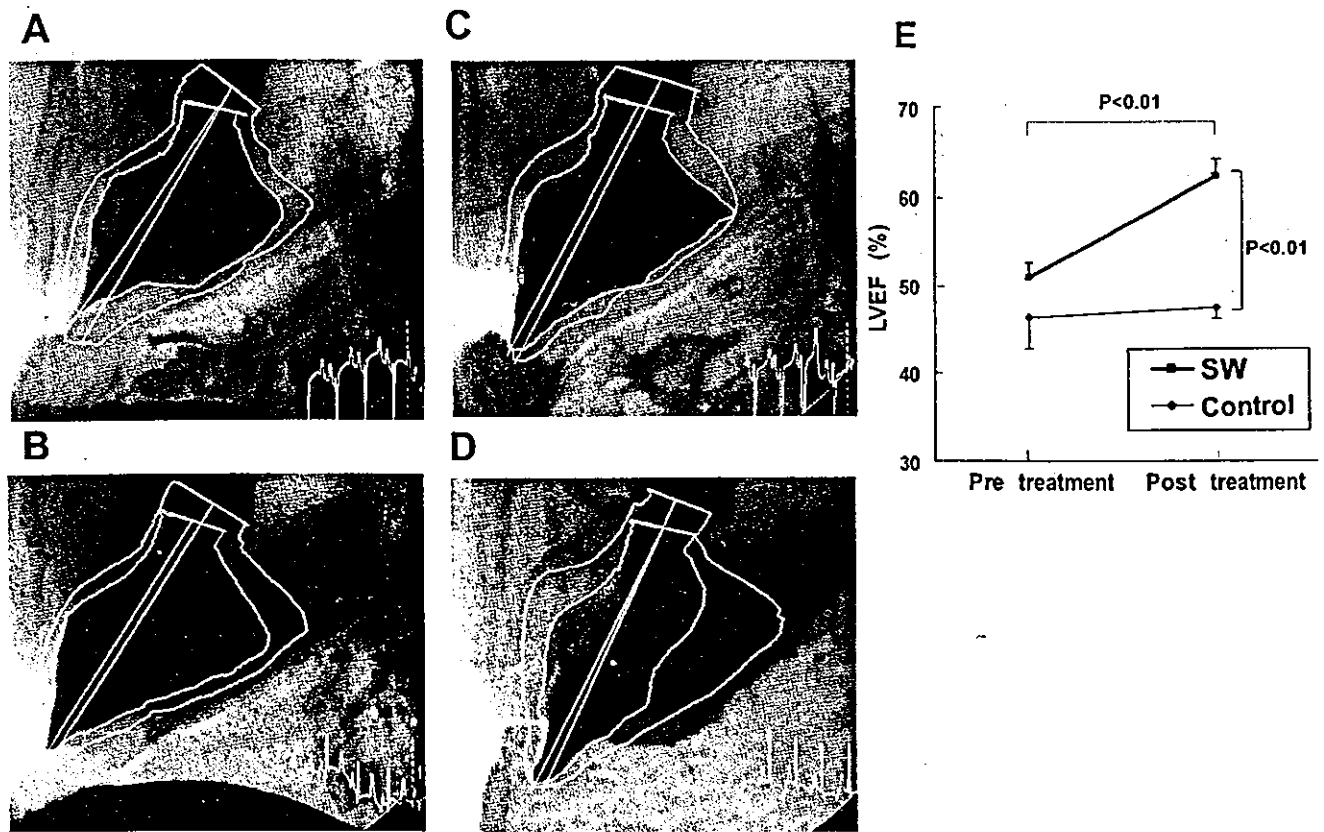


Figure 4. Extracorporeal cardiac SW therapy improves ischemia-induced myocardial dysfunction in vivo. A and C, Four weeks after the implantation of an ameroid constrictor, LV wall motion of the LCx (posterolateral) region was reduced in both the control (A) and the SW group (before the SW therapy) (C). B and D, Four weeks after the first left ventriculography, no significant change in LV wall motion was noted in the control group (B), whereas marked recovery was noted in the SW group (D). E, The SW therapy normalized left ventricular ejection fraction in the SW group but not in the control group. Results are expressed as mean \pm SEM (n=8 each).

Statistical Analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. We determined statistical significance by analysis of variance for multiple comparisons. A value of $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results

Effect of SW on mRNA Expression of VEGF and Flt-1 in HUVECs

SW treatment significantly upregulated mRNA expression of VEGF and its receptor Flt-1 in HUVECs, with a maximum effect noted at 0.09 mJ/mm² (Figure 2).

Effects of Extracorporeal Cardiac SW Therapy on Angiogenesis and Ischemia-Induced Myocardial Dysfunction

Four weeks after ameroid implantation, coronary angiography demonstrated a total occlusion of the LCx, which was perfused via collateral vessels with severe delay in both the control (Figure 3A) and the SW groups (Figure 3C). At 8 weeks after ameroid implantation (4 weeks after SW therapy), the SW group (Figure 3D), but not the control group (Figure 3B), had a marked development of coronary collateral vessels in the ischemic LCx region, an increased Rentrop score (Figure 3E), and an increased number of visible coronary arteries in the region (Figure 3F). Similarly, at 4 weeks, left ventriculography demonstrated an impaired left

ventricular ejection fraction in both groups (Figure 4A, 4C, and 4E), whereas at 8 weeks, left ventricular ejection fraction was normalized in the SW group but remained impaired in the control group (Figure 4B, 4D, and 4E).

Effects of Extracorporeal Cardiac SW Therapy on Regional Myocardial Function and Myocardial Blood Flow

We serially measured WTF of the LCx region (lateral wall of the LV) by epicardial echocardiography. At 4 weeks, we observed a significant reduction in WTF (%) in both groups (13 \pm 2 in the control group and 13 \pm 3 in the SW group; Figure 5A). At 8 weeks, however, the SW treatment markedly improved WTF in the SW group (30 \pm 3) but not in the control group (9 \pm 2) under control conditions (Figure 5A). Under dobutamine-loading conditions, which mimicked exercise conditions, WTF was further reduced at 4 weeks after the ameroid implantation in both groups (16 \pm 3 in the control and 18 \pm 2 in the SW groups), however, at 8 weeks, WTF was again markedly ameliorated only in the SW group (31 \pm 2) but not in the control group (16 \pm 4) (Figure 5B).

At 4 weeks, RMBF in the endocardium and epicardium (mL \cdot min⁻¹ \cdot g⁻¹) was equally decreased in both groups (1.0 \pm 0.3 and 0.9 \pm 0.2 in the control group and 1.0 \pm 0.2 and 0.9 \pm 0.2 in the SW group, respectively). The SW treatment again improved RMBF in the endocardium (0.6 \pm 0.1 in the

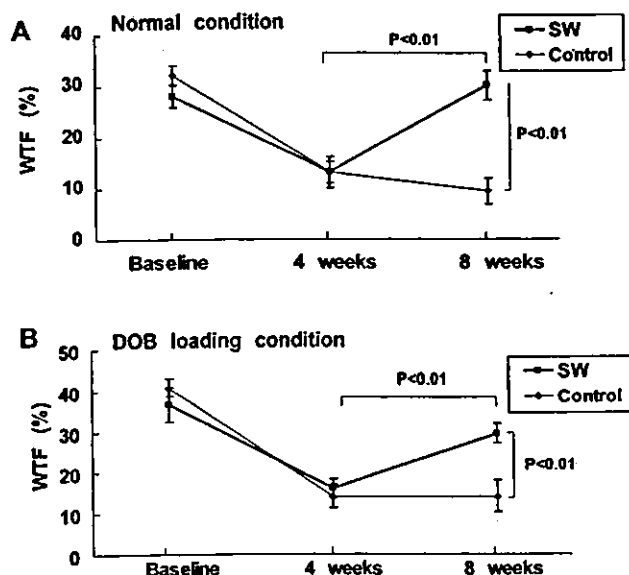


Figure 5. Extracorporeal cardiac SW therapy improves regional myocardial function in vivo. SW therapy induced a complete recovery of WTF of the ischemic lateral wall under control conditions (A) and under dobutamine (DOB) loading conditions (B). Results are expressed as mean±SEM (n=8 each).

control group and 1.4 ± 0.3 in the SW group, $P < 0.05$; Figure 6A) as well as in the epicardium (0.7 ± 0.2 in the control group and 1.5 ± 0.2 in the SW group, $P < 0.05$; Figure 6B).

Effects of Extracorporeal Cardiac SW Therapy on Capillary Density and VEGF Expression in the Ischemic Myocardium

Factor VIII staining showed that the number of factor VIII-positive capillaries was increased in the SW group compared with the control group (Figure 7A and 7B). Quantitative analysis demonstrated that the number of capil-

laries was significantly higher in the SW group in both the endocardium (840 ± 26 in the control group and 1280 ± 45 in the SW group, $P < 0.05$; Figure 7C) and the epicardium (820 ± 30 in the control group and 1200 ± 22 in the SW group, $P < 0.05$; Figure 7D). RT-PCR analysis and Western blotting demonstrated a significant upregulation of VEGF mRNA expression (8.0 ± 6 in the control group and 32 ± 8 in the SW group, $P < 0.05$; Figure 8A) and protein expression (2.23-fold increase in the SW groups, $P < 0.05$; Figure 8B) after the SW treatment to the ischemic myocardium in vivo.

Side Effects of Extracorporeal Cardiac SW Therapy

All animals treated with the SW therapy were alive and showed no arrhythmias as assessed by 24-hour Holter ECG during and after the treatment (n=3; data not shown). There also was no myocardial cell damage as assessed by serum concentrations of CK-MB (ng/mL); the values before the SW treatment and at 4, 5 (2 hours after the SW treatment), and 8 weeks after the ameroid implantation were 5.0 ± 0.6 , 6.2 ± 0.5 , 5.5 ± 0.2 , and 7.1 ± 0.9 in the control group and 5.1 ± 0.2 , 7.7 ± 0.6 , 6.1 ± 0.6 , and 6.4 ± 0.4 in the SW group, respectively (n=6 each). The serum concentrations of troponin T were not detected in most cases in both groups. No significant differences were noted in hemodynamic variables (eg, heart rate or blood pressure) between the 2 groups (data not shown).

Discussion

The novel finding of the present study is that the extracorporeal cardiac SW therapy enhances angiogenesis in the ischemic myocardium and normalizes myocardial function in a porcine model of chronic myocardial ischemia in vivo. To the best of our knowledge, this is the first report that demonstrates the potential usefulness of extracorporeal cardiac SW therapy as a noninvasive treatment of chronic myocardial ischemia.

Extracorporeal Cardiac SW Therapy as a Novel Strategy for Ischemic Cardiomyopathy

Because of the poor prognosis of ischemic cardiomyopathy,^{1,9} it is crucial to develop an alternative therapy for ischemia-induced myocardial dysfunction. To accomplish effective angiogenesis, it is mandatory to upregulate potent angiogenesis ligands, such as VEGF, and their receptors.^{9,10} Furthermore, in the clinical setting, the goal for the treatment of ischemic cardiomyopathy should include not only enhancement of angiogenesis but also recovery of ischemia-induced myocardial dysfunction. In the present study, we were able to demonstrate that SW treatment (1) normalized global and regional myocardial functions as well as RMBF of the chronic ischemic region without any adverse effects in vivo, (2) increased vascular density in the SW-treated region, and (3) enhanced mRNA expression of VEGF and its receptor Flt-1 in HUVECs in vitro and VEGF production in the ischemic myocardium in vivo. Thus, SW-induced upregulation of the endogenous angiogenic system may offer a novel and promising noninvasive strategy for the treatment of ischemic heart disease.

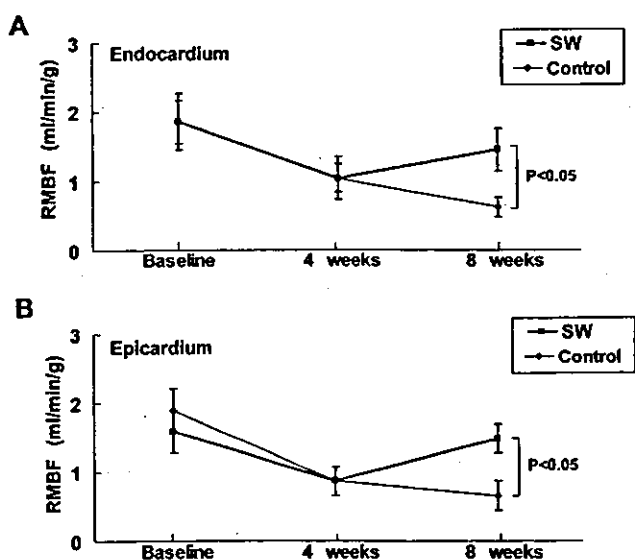


Figure 6. Extracorporeal cardiac SW therapy improves RMBF in vivo. SW therapy significantly increased RMBF, assessed by colored microspheres in both the endocardium (A) and the epicardium (B). Results are expressed as mean±SEM (n=8 each).

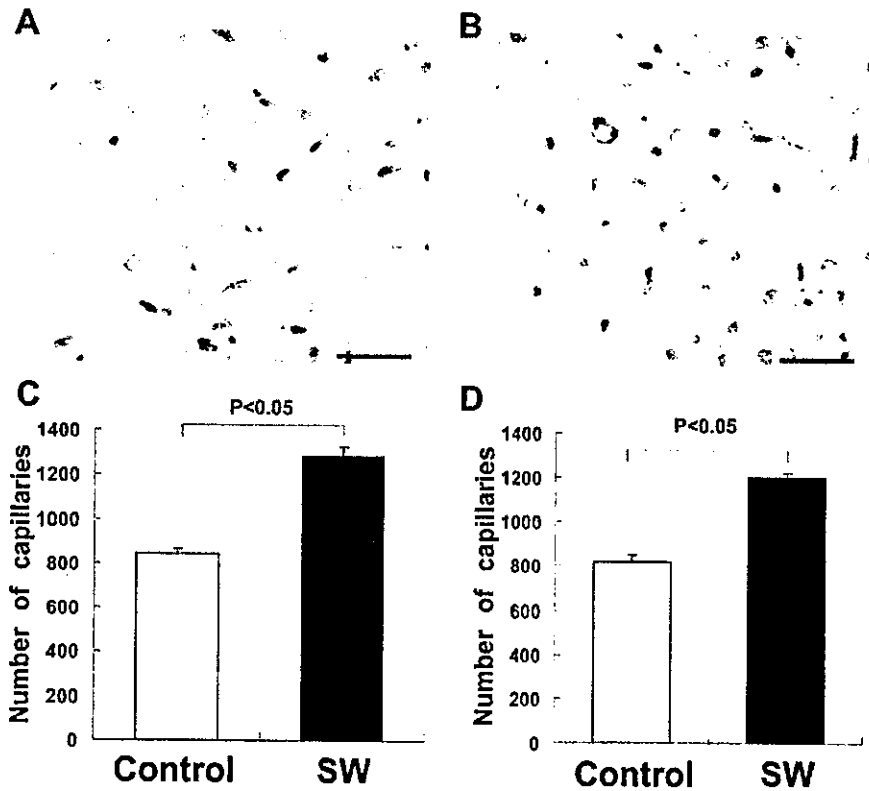


Figure 7. Extracorporeal cardiac SW therapy increases the density of factor VIII-positive capillaries in the ischemic myocardium. A and B, Factor VIII staining of the LCx region from the control (A) and the SW group (B). Scale bar represents 20 μ m. C and D, Capillary density was significantly greater in the SW group (SW) than in the control group (Control) in both the endocardium (C) and the epicardium (D). Results are expressed as mean \pm SEM (n=6 each).

Advantages of Extracorporeal Cardiac SW Therapy

Recent attempts to enhance angiogenesis in the ischemic organs include gene therapy and bone marrow cell transplantation therapy. The main purpose of gene therapy is to induce overexpression of a selected angiogenic ligand (eg, VEGF) that leads to angiogenesis in the ischemic region. Although phase 1 trials of gene transfer of plasmid DNA encoding VEGF demonstrated safety and clinical benefit for the treatment of ischemic limb and

heart,¹¹⁻¹³ gene therapy for ischemic cardiomyopathy is still at a preclinical stage. Bone marrow cell transplantation therapy, which depends on adult stem cell plasticity, also may be a useful strategy for angiogenesis because endothelial progenitor cells could be isolated from circulating mononuclear cells in humans and could be shown to be incorporated into neovascularization.¹⁴ However, the need for invasive delivery of those cells to the ischemic myocardium may severely limit its usefulness in clinical situations.

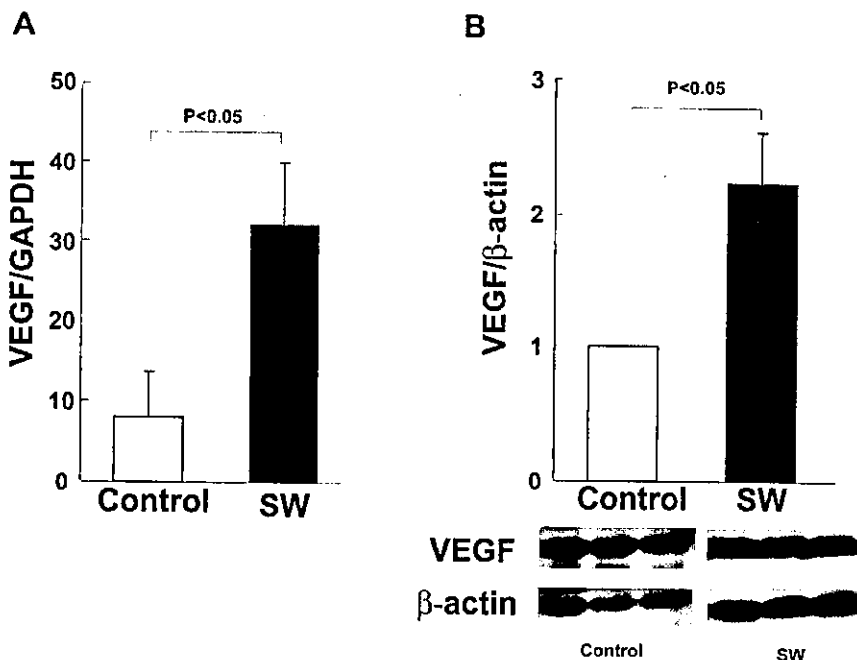


Figure 8. SW treatment upregulated mRNA (A) and protein (B) expression of VEGF in the ischemic myocardium (n=5 each).

A major advantage of the extracorporeal cardiac SW therapy over these 2 strategies is shown by the fact that it is quite noninvasive and safe, without any adverse effects. If necessary, we could repeatedly treat patients (even outpatients) with SW therapy because no surgery, anesthesia, or even catheter intervention is required for the treatment. This is an important factor in determining the clinical usefulness of angiogenic therapies in patients with ischemic cardiomyopathy. Thus, the extracorporeal cardiac SW therapy appears to be an applicable and noninvasive treatment for ischemic heart disease. Indeed, the SW treatment itself already has been clinically established as an effective and safe treatment for lithotripsy and chronic plantar fasciitis.^{15,16} Our present results indicate that SW therapy, at $\approx 10\%$ of the energy needed for lithotripsy treatment, is effective for in vivo angiogenesis in the ischemic heart.

Mechanisms for SW-Induced Angiogenesis

When a SW hits tissue, cavitation (a micrometer-sized violent collapse of bubbles) is induced by the first compression by the positive pressure part and the expansion with the tensile part of a SW.³ Because the physical forces generated by cavitation are highly localized, SW could induce localized stress on cell membranes, as altered shear stress affects endothelial cells.¹⁷ Recent reports have demonstrated the biochemical effects of SW, including hyperpolarization and Ras activation,¹⁸ nonenzymatic nitric oxide synthesis,¹⁹ and induction of stress fibers and intercellular gaps.²⁰ Although precise mechanisms for the SW-induced biochemical effects remain to be examined, these mechanisms may be involved in the underlying mechanisms for SW-induced angiogenesis. Indeed, Wang et al²¹ reported that SW induces angiogenesis of the Achilles tendon–bone junction in dogs.

We were able to demonstrate that the SW treatment upregulated mRNA expression of VEGF and its receptor Flt in HUVECs in vitro and VEGF expression in the ischemic myocardium in vivo. Because the VEGF-Flt system is essential in initiating vasculogenesis and/or angiogenesis,²² this effect of SW could explain, at least in part, the underlying mechanisms for SW-induced angiogenesis. It should be noted, however, that we showed only the upregulation of VEGF and Flt and that the effect of SW on signal transduction after receptor–ligand interaction still remains to be clarified. In addition, we need to fully elucidate the mechanisms for the SW-induced complete recovery of ischemia-induced myocardial dysfunction, although the increased myocardial blood flow caused by the SW treatment appears to play a primary role for the improved myocardial function. Further studies are required to determine the precise molecular mechanism for SW-induced angiogenesis and recovery of myocardial function.

In summary, we were able to demonstrate that noninvasive extracorporeal cardiac SW therapy effectively increases RMBF and normalizes ischemia-induced myocardial dysfunction without any adverse effects. Thus, extracorporeal cardiac SW therapy may be an effective, safe, and noninvasive therapy for ischemic cardiomyopathy.

Acknowledgments

This study was supported in part by a grant from the 21st Century COE Program and grants-in-aid from the Japanese Ministry of

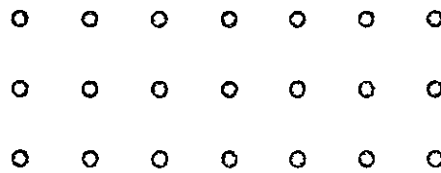
Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Tokyo, Japan (Nos. 12032215, 12470158, 12877114, 13307024, 13557068), and the Japanese Ministry of Health, Labor, and Welfare, Tokyo, Japan. We thank Dr Ernest H. Marlinghaus, Storz Medical AG, Switzerland, for valuable discussion about our study, and Prof S. Mohri at the Center of Biomedical Research, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, for cooperation in this study.

References

- Jessup M, Brozena S. Heart failure. *N Engl J Med*. 2003;348:2007–2018.
- Gutersohn A, Caspari G. Shock waves upregulate vascular endothelial growth factor m-RNA in human umbilical vascular endothelial cells. *Circulation*. 2000;102(suppl):18.
- Apfel RE. Acoustic cavitation: a possible consequence of biomedical uses of ultrasound. *Br J Cancer*. 1982;45(suppl):140–146.
- Maisonhaute E, Prado C, White PC, et al. Surface acoustic cavitation understood via nanosecond electrochemistry, part III: shear stress in ultrasonic cleaning. *Ultrason Sonochem*. 2002;9:297–303.
- O'Konski MS, White FC, Longhurst J, et al. Ameroid constriction of the proximal left circumflex coronary artery in swine: a model of limited coronary collateral circulation. *Am J Cardiovasc Pathol*. 1987;1:69–77.
- Roth DM, Maruoka Y, Rogers J, et al. Development of coronary collateral circulation in left circumflex ameroid-occluded swine myocardium. *Am J Physiol*. 1987;253:H1279–1288.
- Rentrop KP, Cohen M, Blanke H, et al. Changes in collateral channel filling immediately after controlled coronary artery occlusion by an angioplasty balloon in human subjects. *J Am Coll Cardiol*. 1985;5:587–592.
- Prinzen FW, Bassingthwaite JB. Blood flow distributions by microsphere deposition methods. *Cardiovasc Res*. 2000;45:13–21.
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996;380:435–439.
- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996;380:439–442.
- Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, et al. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet*. 1996;348:370–374.
- Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, et al. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation*. 1998;97:1114–1123.
- Losordo DW, Vale PR, Symes JF, et al. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation*. 1998;98:2800–2804.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964–966.
- Auge BK, Preminger GM. Update on shock wave lithotripsy technology. *Curr Opin Urol*. 2002;12:287–290.
- Weil LS Jr, Roukis TS, Weil LS, et al. Extracorporeal shock wave therapy for the treatment of chronic plantar fasciitis: indications, protocol, intermediate results, and a comparison of results to fasciotomy. *J Foot Ankle Surg*. 2002;41:166–172.
- Fisher AB, Chien S, Barakat AI, et al. Endothelial cellular response to altered shear stress. *Am J Physiol*. 2001;281:L529–L533.
- Wang FS, Wang CJ, Huang HJ, et al. Physical shock wave mediates membrane hyperpolarization and Ras activation for osteogenesis in human bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;287:648–655.
- Gotte G, Amelio E, Russo S, et al. Short-time non-enzymatic nitric oxide synthesis from L-arginine and hydrogen peroxide induced by shock waves treatment. *FEBS Lett*. 2002;520:153–155.
- Seidl M, Steinbach P, Worle K, et al. Induction of stress fibres and intercellular gaps in human vascular endothelium by shock-waves. *Ultrasonics*. 1994;32:397–400.
- Wang CJ, Huang HY, Pai CH. Shock wave-enhanced neovascularization at the tendon-bone junction: an experiment in dogs. *J Foot Ankle Surg*. 2002;41:16–22.
- Millauer B, Witzmann-Voos S, Schnurch H, et al. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*. 1993;72:835–846.

重症虚血性心疾患に対する 体外衝撃波治療法

福本義弘 伊藤 昭 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



SUMMARY

最大薬物治療に抵抗性で、血管形成術や冠動脈バイパス術では血行再建が不十分な重症虚血性心疾患に対する治療法は、未だ確立されていない。我々は、結石破碎に用いられている体外衝撃波が、その約1割の出力で、他に治療法のない重症虚血性心疾患患者において、自覚症状・運動負荷試験・負荷心筋シンチ所見を改善することを見出した。一方、副作用は全く認めず、重症虚血性心臓病に対する体外衝撃波治療は安全かつ有効であり、今後有用な治療法となり得ると考えている。

はじめに

現在、虚血性心疾患に対する治療は、薬物療法、カテーテルを用いた冠動脈インターベンション (PCI)、外科的冠動脈バイパス術 (CABG) の3つに大別される。しかしながら、人口の高齢化や生活習慣の欧米化に伴い、従来の治療では不十分な重症虚血性心疾患が増加してきている。これらの重症例では狭心症のコントロールが困難なばかりでなく、慢性心筋虚血による心機能の低下、心拡大が生じ、最終的には重症の心不全へと進行し、予後も不良である。このような従来の治療法では解決できない重症の虚血性心疾患に対して、レーザーによる心筋内血管新生療法、体外式カウインターパルスーションや間欠的ウロキナーゼ投与

などが試みられてきたが、いずれもその有用性は確認されていない。

① 新しい治療 (血管新生)

近年、閉塞性動脈硬化症をはじめとする下肢慢性動脈閉塞症に対する治療的血管新生療法として、遺伝子治療や細胞療法の臨床試験が欧米¹⁾およびわが国で実施、検討されている²⁾。虚血心筋に対しても、血管内皮増殖因子 (VEGF) 遺伝子の投与により血管新生を誘導する遺伝子治療の有効性が報告されている³⁾。また血管内皮前駆細胞を注入することで血管新生を誘導し、虚血症状を軽減させるという治療戦略が、いくつかの施設で

始まっている。しかしながらこれらは、全身麻酔下での骨髄穿刺や開胸操作という大きな侵襲を伴い、その反復実施は実際困難である。したがって、より低侵襲で反復可能な治療法の開発が待たれる。

② 体外衝撃波の作用

体外衝撃波治療は、尿路結石などの結石破碎治療の標準的治療としてわが国でも普及しており、整形外科領域においても広く応用されている。我々はヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) に対し衝撃波を照射すると、結石破碎に用いる出力の約 10% 程度の出力をピークに、血管新生因子である VEGF およびその受容体である Flt-1 の mRNA の発現増加を認め、衝撃波による血管新生治療の可能性を見出した⁹⁾。

次に約 4 週間かけて徐々に内腔が閉塞するアメリロイドコンストラクターを用いたブタ慢性心筋虚血モデルを作成し、虚血領域に体外衝撃波治療 (0.09 mJ/mm^2 : 結石破碎の約 10%, 虚血領域 9 ヶ所に 200 shots/spot, 1 週間に 3 回実施) を行った。体外衝撃波治療中および治療後のホルター心電図では、不整脈は 1 例も認めず、また、突然死も認めなかった⁹⁾。組織学的に冠微小血管の増生を認めるものの (図 1)、心筋の出血や梗塞病変は認めず、同療法の有効性および安全性を確認した⁹⁾。

③ 重症虚血性心疾患患者に対する体外衝撃波療法の臨床応用

上記の基礎研究の知見に基づき、体外衝撃波治療が、重症虚血性心疾患に対する低侵襲性治療として有用かつ安全であると結論し、九州大学医学部倫理委員会の承認を得た上で、2003 年 1 月より臨床試験を開始している。適応基準は、1) 20 歳以上、2) 最大量薬物治療に抵抗性で、PCI や

CABG では完全な血行再建が不可能、3) カナダ心臓病学会分類で、Class II~IV、4) 負荷心筋シンチや負荷心エコーで虚血領域を認める重症虚血性心疾患、とした。体外衝撃波治療により期待される効果および可能性のある合併症 (死亡、心筋障害と心機能障害、不整脈、血栓塞栓症、呼吸不全、出血、溶血、心嚢液貯留) の説明を十分に行った上で、インフォームドコンセントを得て治療を実施している。除外基準は、ペースメーカー植え込み術後、弁置換術後、自動除細動器植え込み術後、3 ヶ月以内の Q 波心筋梗塞、6 週間以内の非 Q 波心筋梗塞、明らかな左室内血栓、悪性腫瘍の併存、とした。心臓専用衝撃波治療装置は、本治療のために STORZ 社と共同開発した MODULITH SLC (図 2) で、心臓超音波装置を内蔵しており、虚血部位に焦点を合わせ、衝撃波を照射できる。衝撃波の出力は 0.09 mJ/mm^2 、照射回数は 1 ヶ所につき 200 回とし、20~40 ヶ所、1 週間に 3 回行うことを 1 クールとし、心筋虚血の程度に応じて、1~3 クール実施している。患者は、衝撃波治療中強い痛みを訴えることはなく、入眠する患者もいる。不整脈や心筋壊死も認めていない。現在までに 9 症例において 6 ヶ月後の評価を終えており、そのうち 2 例について、結果を呈示する。

{症例 1}

57 歳、男性。2002 年 10 月より労作性狭心症が出現し、2003 年 1 月当科入院。3 枝病変を認め、ジピリダモール負荷心筋シンチでは心尖部に虚血を認めた。虚血の責任病変である左前下行枝は、びまん性の高度狭窄病変で、PCI、CABG ともに不適と判断され、体外衝撃波治療を行った。左前下行枝領域の 13~17 ヶ所に衝撃波照射を 1 クール実施した。退院後は、自覚症状の改善を認め、1 ヶ月後のジピリダモール負荷心筋シン

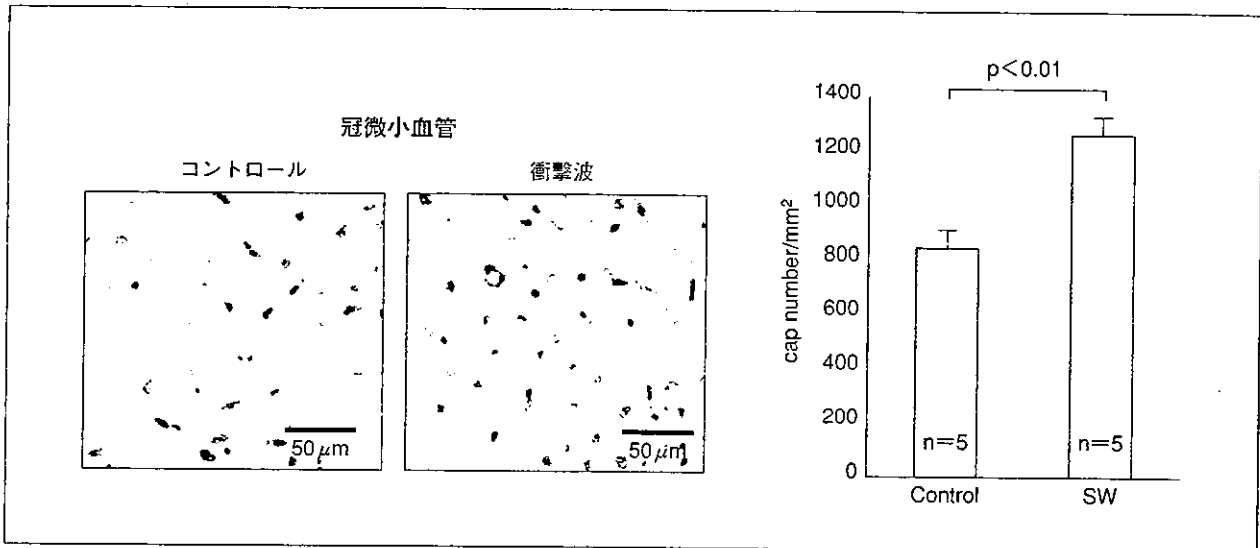


図1 衝撃波によるブタ冠動脈血管新生

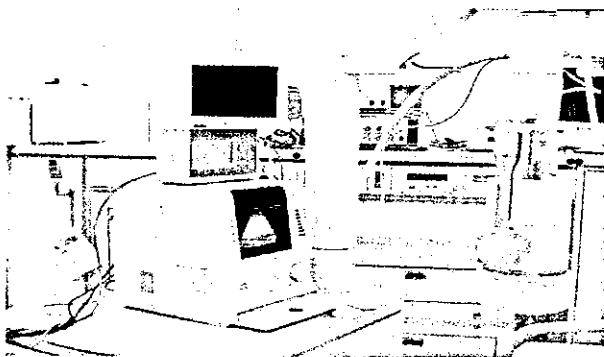


図2 衝撃波照射装置 (STORZ 社製 MODULITHSLC)

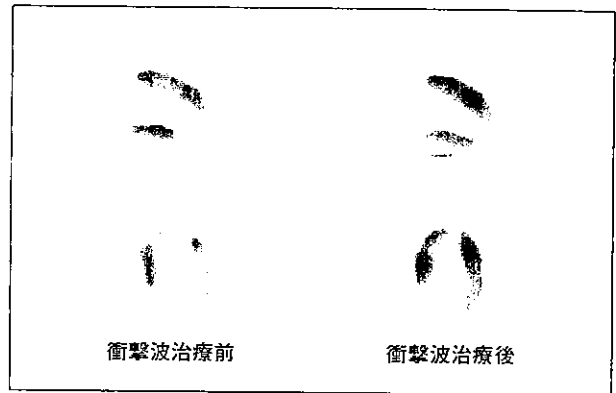


図3 衝撃波治療による心筋虚血の改善
ジピリダモール負荷心筋スペクト (ジピリダモール負荷時)。衝撃波治療前に認められていた心尖部の虚血 (左側) は、衝撃波治療1ヵ月後に改善している (右側)。

チでは、心尖部の虚血が改善していた (図3)。

〔症例2〕

66歳、男性。労作性狭心症。びまん性の重症3枝病変であり、PCI、CABGのいずれも施行できず、最大限の内服治療でも狭心症のコントロールが難しく、2003年3月に当科へ紹介入院となった。冠動脈造影上、PCI、CABGは困難と考え、体外衝撃波を、虚血領域の約40ヵ所に、1ヵ所あたり200回で1クール実施した。照射後、心筋逸脱酵素の上昇や新たな不整脈の出現は認めな

かった。退院後は自覚症状の改善を認めた。1ヵ月後のジピリダモール負荷心筋シンチでは、前壁中隔および下後壁の虚血の改善傾向を認め、冠動脈造影時に行った右心房ペースング (100/分) において、衝撃波治療前に認めた心筋乳酸産生 (大動脈：0.70 mmol/L、冠静脈洞：0.72 mmol/L) は、治療後には認めなかった (大動脈：0.78 mmol/L、冠静脈洞：0.64 mmol/L)。

衝撃波治療により、これまでのところ、全例で自覚症状の改善が得られ、他覚的にも、負荷心筋シ

ンチでの虚血の改善が認められている。冠動脈造影上は、明らかな側副血行路の出現は認められず、目に見えるレベルの血管新生がその機序として関与し

ているのではなく、冠動脈造影で見えない微小血管レベルで血管新生が生じているためと考えられる。

おわりに

重症虚血性心疾患に対する体外衝撃波療法について、我々が行った基礎研究ならびに現在実施中の臨床試験を紹介した。重症虚血性心疾患に対する体外衝撃波療法は、極めて低侵襲であり、血管新生を誘導することにより心筋血流を改善させる

ことが期待できる新たな治療法であることが示唆された。今後、その有効性および安全性がさらに確認できれば、外来での治療も可能であると考えられ、虚血性心疾患に対する新たな治療法として期待される。

(参考文献)

- 1) Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, et al. : Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patients with ischaemic limb. *Lancet*, 48 : 370-374, 1996.
- 2) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al. : Therapeutic angiogenesis using cell transplantation (TACT) study investigators. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells : a pilot study and a randomized controlled trial. *Lancet*, 360 (9331) : 427-435, 2002.
- 3) Losordo DW, Vale PR, Symes JF, et al. : Gene therapy for myocardial angiogenesis : initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation*, 98 : 2800-2804, 1998.
- 4) Nishida T, Oi K, Tatewaki H, et al. : Extracorporeal cardiac shock wave therapy induces a complete recovery of ischemia-induced myocardial dysfunction in pigs in vivo. *Circulation*, 108 (17) IV-95, 2003.

特集：九州大学病院統合1周年記念企画

次世代低侵襲性医療の開発

九州大学大学院医学研究院 循環器内科学

下 川 宏 明

はじめに

今世紀、我が国は未曾有の高齢化社会を迎えている。こうした中において、患者への負担が小さい低侵襲性医療技術の開発は、患者の早期の社会復帰を支援できる点において、また、医療経済的な見地からも、その重要性が認識されてきている。内視鏡治療が世界的に普及し、また、本特集でも述べられているロボット治療が開発されている理由もそこにある。本稿では、現在我々が開発している次世代の低侵襲性医療(治療・診断)の開発について概説する。

1. 低出力体外衝撃波による重症虚血性心疾患に対する非侵襲性治療

虚血性心疾患に対する治療法は、現在、薬物治療、冠動脈インターベンション、冠動脈バイパス手術の3つの方法があるが、人口の高齢化や生活様式の欧米化などに伴い、重症の虚血性心疾患が増加し、冠動脈インターベンションや冠動脈バイパス術が適応にならないような症例が増加してきている。このような症例は、QOLの低い日常生活を余儀なくされている。こうした重症の虚血性心疾患に対して、現在、遺伝子治療や細胞療法などの開発が検討されているが、その効果や安全性についてはなお検討すべき点が多く、また、遺伝子や細胞の虚血心筋への注入に侵襲的な開胸操作を必要とし、反復施行は実際上困難である。

我々は、衝撃波が培養内皮細胞で血管新生因子の発現を亢進させるという報告¹⁾に着目し、体外衝撃波を用いた虚血心筋に対する非侵襲性の血管新生療法を開発した。まず、ヒト培養内皮細胞において、結石破碎療法に用いられている出力の約10%の低出力衝撃波(0.09 mJ/mm²)が最も効率よくVEGFやその受容体であるFlt-1の発現を増強することを確認した(2)。続いて、この低出力衝撃波を用いた治療(0.09 mJ/mm²の低出力衝撃波を心筋虚血部位9カ所に1カ所当たり200発照射し、1週間で3回施行)が、ブタの慢性虚血心筋において血管新生を促進し、局所心筋血流を改善し、結果的に局所壁運動を改善させること、その機序の一つとして、虚血心筋におけるVEGF発現を亢進させることを認めた²⁾。また、不整脈や心筋傷害などの副作用は全く認めなかった。衝撃波の血管新生因子の発現促進作用の機序として、衝撃波は、細胞内で「cavitation効果」といわれるマイクロメートルレベルのバブルの形成と破裂を惹起し³⁾、それが一種のずれ応力として長く記憶されると考えられている⁴⁾。

こうした一連の基礎的検討結果を踏まえ、医学部倫理委員会の承認を得て、昨年1月より、従来の治療法を行うことが困難な重症虚血性心疾患を有する患者を最初の対象として、同治療法の有効性・安全性を検討する臨床試験を開始した(図1)。基礎的検討と同様の方法で、虚血心筋20~40カ所に衝撃波治療を行い、治療前および1・3・6ヶ月後に、冠動脈造影、左室造影、心筋シンチグラム、心エコー等を施行した。その結果、6ヶ月後の時点で、治療を行ったほぼ全ての患者において、自覚症状・運動耐容能・心筋血流の改善を認め、また、不整脈や心筋傷害などの副作用は認めなかった(図2)⁵⁾。

現在、臨床試験を継続するとともに、基礎的研究において、心筋梗塞後の心室リモデリングの抑制(ブタ)や閉塞性動脈硬化症に対する有効性(ウサギ)を示す予備的結果が得られつつある(未発表データ、後者は第2外科との共同研究)。低出力体外衝撃波を用いた血管新生療法は、その有効性・安全性に加えて、非侵襲性であり、将来的には外来でも反復実施できる点が最大の特徴である。医療費も大幅に節減できることが期待される。今後、慎重に検討を重ねていきたい。

Hiroaki SHIMOKAWA

Department of Cardiovascular Medicine Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University
Development of Next Generation of Non-Invasive Medicine