

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

骨髄幹細胞移植による難治性血管炎への血管再生医療に
関する多施設共同研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 池田 宇一

平成18(2006)年4月

総括研究報告

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

（総括）研究報告書

「骨髄幹細胞移植による難治性血管炎への血管再生医療に関する 多施設共同研究」

主任研究者 池田 宇一

信州大学大学院医学研究科 臓器発生制御医学講座 教授

研究要旨：

難治性血管炎患者に対する自己骨髄細胞移植による血管再生療法の有効性と安全性を多施設臨床試験により検証し、さらに、疾患モデル動物を用いた基礎的研究により本治療法の作用機序を解明して、より侵襲が少ない治療法を開発することを目的として本研究を行った。症例数をさらに集積するため、膠原病症例に対し本治療法を積極的に行っている3施設（新潟大学、横浜市立大学、日本医科大学）を平成18年度より本研究班に加えることとなった。平成17年度までに、班員施設およびに参加予定施設において、計89例の重症虚血肢患者に自己骨髄細胞移植療法を施行した。そのうちバージャー病が29例、膠原病が15例であり、自己骨髄細胞移植療法の有効性と安全性を認めている。また、平成16年12月までの多施設臨床試験（TACT-1）における閉塞性動脈硬化症（ASO）125例、バージャー病65例において、アンケート調査による集計を行い、その治療効果や有害事象の解析を行った。さらに、薬剤やサイトカイン投与による骨髄幹細胞動員療法の基礎的検討も行っている。難治性血管炎に対して血管再生療法を実施しているのは海外を含め我々の研究班以外にはなく、本研究成果は世界をリードする重要な情報となっている。

分担研究者

松原 弘明 京都府立医科大学
大学院医学研究科
循環器病態学 教授

室原 豊明 名古屋大学大学院医学研究科
器官制御内科学 教授

簗田 清次 自治医科大学医学部
アレルギー膠原病学

天野 純 信州大学医学部
外科学 教授

高橋 将文 信州大学大学院医学研究科
臓器発生制御医学 助教授

ており、特定従来の治療法が無効で指趾切断に至る症例も少なくない。申請者らは、骨髄細胞移植療法が閉塞性動脈硬化症（ASO）やバージャー病による重症虚血肢に有効であることを既に明らかとしてきた。しかし、より多くのバージャー病症例での検証が必要であり、膠原病性の難治性血管炎における本治療法の有効性についても未だ明らかではない。そこで、本研究では、臨床試験により難治性血管炎患者に対する自己骨髄細胞移植による血管再生療法の有効性と安全性を検証することを目的とし、研究を行った。また、その作用機序の解明や全身麻酔下での骨髄採取を必要としないより侵襲の少ない新たな血管再生療法の開発も重要な課題であることから、基礎的研究による作用機

A. 研究目的

難治性血管炎は、特定疾患の一つに指定され

序の解明とより侵襲の少ない新たな治療法の開発についても目的としている。

B. 研究方法

(1) 多施設臨床試験による骨髄幹細胞移植療法の有効性と安全性の検証

より多くの症例を集積するため、膠原病症例に対して骨髄幹細胞移植療法を積極的に行っている施設（新潟大学、横浜市立大学、日本医科大学）が平成 18 年度より本研究班に参加することとなった。平成 17 年度までの班員施設（信州大学、京都府立医科大学、名古屋大学、自治医科大学）および参加予定施設における ASO やバージャー病、膠原病による難治性血管炎に対する血管再生療法の実施症例計 89 例、さらに、平成 16 年 12 月までの本邦 14 施設での多施設臨床試験（TACT-1）における ASO とバージャー病の本治療法の実施症例計 125 例での臨床成績を集計してそれらの臨床経過および長期予後、有害事象についての解析を行った。評価項目としては、疼痛レベル（VAS）、上下肢血圧比（ABI）、潰瘍直径、歩行距離などについて検討した。

(2) 基礎的研究による作用機序の解明とより侵襲の少ない新たな治療法の開発

マウス下肢虚血および血管傷害モデルを作製して、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）やエリスロポエチン（EPO）による骨髄幹細胞動員効果についてはフローサイトメーター法で、治療効果についてはレーザードップラーによる血流評価や組織学的解析により検討した。

（倫理面への配慮）本臨床研究は、すでに各研究者所属機関における倫理委員会の承認を得ている。本臨床研究に参加する患者には、十分な説明と同意によりインフォームドコンセントを得る。患者データの解析については、患者番号による匿名化を行う。ヒト組織・細胞を研

究に用いる場合は、「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」（平成 10 年度厚生科学審議会答申）ならびに各研究者所属機関における倫理委員会規定に基づき、同委員会の承諾と十分なインフォームドコンセントのもとに行う。また、動物実験については、各研究者所属機関における委員会規定に基づき、同委員会の承諾と十分な配慮のもとで実施する。

C. 研究結果

(1) 多施設臨床試験による骨髄幹細胞移植療法の有効性と安全性の検証

平成 17 年度までに、班員施設およびに参加予定施設において、計 89 例の重症虚血肢患者に自己骨髄細胞移植療法を施行した。そのうちバージャー病が 29 例、膠原病が 15 例（強皮症（SSc）：10）、混合性結合組織病（MCTD）：2）、CREST（2）、好酸球増多症（1））であり、自己骨髄細胞移植療法の有効性と安全性を認めている。また、現在、膠原病患者（SSc と MCTD）3 例に自己末梢血単核球の繰り返し移植による血管再生療法が進行中である。平成 16 年 12 月までの多施設臨床試験（TACT-1）の集計結果では、閉塞性動脈硬化症（ASO）125 例、バージャー病 65 例において、移植療法 1 年および 2 年後まで観察しえた症例は、それぞれ 20 例および 14 例であった。これら症例における疼痛スケール（VAS）、上下肢血圧比（ABI）、潰瘍サイズ、歩行距離などの指標は、移植後に有意に改善していたが、その改善度は時間経過と共に低下する傾向にあった。この低下の程度は、ASO がバージャー病よりも有意に大きく、ASO 症例よりもバージャー病症例で治療効果が持続する傾向にあった。しかし、バージャー病 ABI の 2 年後値を除いていずれの指標においても 2 年後での値は前値と比較して有意に改善していた。有害事象については、バージャー病で 3 例（4.6%：心筋梗塞、膵炎、胃癌が各 1 例）、ASO で 11 例（8.8%）を認めた。現在、さらに TACT-1 での

症例におけるその後の臨床経過や平成 17 年分の症例についてもアンケートによる集計を行い、その治療効果や安全性の解析を行っている。

(2) 基礎的研究による作用機序の解明とより侵襲の少ない新たな治療法の開発

G-CSF 投与によるマウス傷害血管モデルに対する血管修復作用を検討し、G-CSF の傷害前からの投与が、傷害血管の再内皮化と新生内膜形成の抑制に有効であることを明らかとした。しかし、G-CSF の傷害直後からの投与は、これらの効果が減弱されることが示された。また、臨床的に G-CSF 投与による血栓などの有害事象が報告されていることから、低用量 G-CSF による虚血部位局所への直接作用についても検討し、低用量 G-CSF の局所投与によって虚血部位での血管新生が誘導され、血流が改善することが示された。

D. 考察

本研究により、ASO に比較してバージャー病のほうが骨髄幹細胞移植療法の治療効果が高いことが示され、治療 2 年後においても治療前と比較して有効であることが明らかとなった。しかし、長期経過観察の症例が少なく、今後さらなる症例の積み重ねが必要であると考えられた。一方、膠原病症例では、原疾患そのものも違いがあることから、その評価は困難である。そこで、さらに症例を集積するために平成 18 年度より膠原病症例に対する本治療法を積極的に行っている新たな分担研究施設を追加した。基礎的研究では、G-CSF の投与により骨髄採取による患者負担を減少させて効果的な血管新生を誘導する可能性が示された。今後、作用機序の解明とともに種々の薬剤やサイトカインによる新たな治療法の確立についての研究をさらに進めていく予定である。

E. 結論

バージャー病や膠原病による難治性血管炎による指趾の血行障害を有する患者に対して、自己骨髄幹細胞移植による血管再生療法の多施設臨床試験を行い、その有効性と安全性を検証した。また、本治療法の作用機序の解明とより侵襲が少なく患者さんに優しい治療法の開発を目的として、サイトカイン投与による骨髄幹細胞動員療法の有効性についても検討した。本研究により、難治性血管炎に対する日本発の新たな治療法が確立されるものと期待される。

F. 研究発表 (論文発表)

主任研究者：池田宇一

1. Yoshioka T, Takahashi M, Shiba Y, Suzuki C, Morimoto H, Izawa A, Ise H, Ikeda U. G-CSF Accelerates Reendothelialization and Reduces Neointimal Formation After Vascular Injury in Mice. *Cardiovasc Res* 70:61-69.2006
2. Jia L, Takahashi M, Yoshioka T, Morimoto H, Ise H, Ikeda U. Therapeutic potential of endothelial progenitor cells for cardiovascular diseases. *Current Vascular Pharmacology* 4:59-65.2006
3. Izawa A, Sano K, Takehara M, Inobe M, Suzuki J, Inamura H, Takahashi M, Ikeda U, Isobe M, Uede T. Cre/loxP-mediated CTLA4IgG genetransfer induces clinically relevant immunosuppression via off-off generecombination in vivo. *Cardiovasc Res* 69:289-297.2005
4. Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H, Yasu T, Misawa Y, Takeuchi K, Matsui K, Yamamoto K, Terao K, Shimada K, Ikeda U, Ozawa K, Hanazono, Y. Repair of infarcted myocardium mediated by transplanted bone marrow-derived CD34+ stem cells in a nonhuman primate model. *Stem Cells* 23: 355-364. 2005
5. Suzuki F, Hashikura Y, Ise H, Ishida A, Nakayama J, Takahashi M, Miyagawa S, Ikeda U. MCI-186 (Edaravone), a free radical scavenger, attenuates liver ischemia-reperfusion injury rats. *Transplant International* 18: 844-853. 2005
6. Maeda Y, Yoshioka T, Ikeda U. Inflammatory cytokines and atherosclerosis possible application for the gene therapy. *Vascular Disease Prevention* 2: 115-120. 2005
7. Ise H, Nikaido T, Negishi N, Sugihara N, Suzuki F, Akaike T, Ikeda U. Effective hepatocyte transplantation using rat hepatocytes with low asialoglycoprotein receptor expression. *Am J*

- Pathol 165: 501-510, 2004
8. Muroi K, Kawano-Yamamoto C, Nagashima T, Mori M, Ozawa K, Matsui K, Murakami Y, Ikeda U. Analysis of hematopoietic progenitors in bone marrow from patients with peripheral artery disease. *Leuk Res* 28: 999-1000, 2004
 9. Eizawa T, Ikeda U, Murakami Y, Matsui K, Yoshioka T, Suzuki C, Takahashi M, Muroi K, Kamisawa O, Fuse K, Shimada K. Increase in circulating endothelial progenitor cells after aortic aneurysm repair. *Heart Vessels* 19: 107-110, 2004
 10. Eizawa T, Ikeda U, Murakami Y, Matsui K, Yoshioka T, Takahashi M, Muroi K, Shimada K. Decrease in circulating endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease. *Heart* 90: 685-686, 2004
 11. Yoshioka T, Okada T, Maeda Y, Ikeda U, Shimpo M, Nomoto T, Takeuchi K, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Takahashi M, Matsushita T, Mizukami H, Hanazono Y, Kume A, Ookawara S, Kawano M, Ishibashi S, Shimada K, Ozawa K. Adeno-associated virus vector-mediated interleukin-10 gene transfer inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Gene Ther* 11: 1772-1779, 2004
- 分担研究者：松原弘明
12. Irie H, Okigaki M, Zen K, Takamiya M, Takahashi T, Azuma A, Tatsumi T, Matsubara H. Carbon Dioxide-Rich Water Bathing Enhances Collateral Blood Flow In Ischemic Hindlimb via Mobilization of Endothelial Progenitor Cells and Activation of NO-cGMP System. *Circulation* 111: 1523-1529, 2005
 13. Tatsumi T, Akashi K, Keira N, Matoba S, Mano A, Shiraishi J, Yamanaka S, Kobara M, Hibino N, Hosokawa S, Asayama J, Fushiki S, Fliss H, Nakagawa M, Matsubara H. Cytokine-induced nitric oxide inhibits mitochondrial energy production and induces myocardial dysfunction in endotoxin-treated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 37: 775-84, 2004
 14. Mano A, Tatsumi T, Shiraishi J, Keira N, Nomura T, Takeda M, Nishikawa S, Yamanaka S, Matoba S, Kobara M, Tanaka H, Shirayama T, Takamatsu T, Nozawa Y, Matsubara H. Aldosterone directly induces myocyte apoptosis through calcineurin-dependent pathways. *Circulation* 110: 317-23, 2004
 15. Amano K, Okigaki M, Adachi Y, Fujiyama S, Mori Y, Kosaki A, Iwasaka T, Matsubara H. Mechanism for IL-1beta-mediated neovascularization unmasked by IL-1beta knock-out mice. *J Mol Cell Cardiol* 36: 469-480, 2004
 16. Matsubara H. Risk to the coronary arteries of intracoronary stem cell infusion and G-CSF cytokine therapy. *Lancet* 363: 746-7, 2004
 17. Higashi Y, Kimura M, Hara K, Noma K, Jitsuiki D, Nakagawa K, Oshima T, Chayama K, Sueda T, Goto C, Matsubara H, Murohara T, Yoshizumi M. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia. *Circulation* 109: 1215-1218, 2004
 18. Bove CM, Yang Z, Gilson WD, Epstein FH, French BA, Berr SS, Bishop SP, Matsubara H, Carey RM, Kramer CM. Nitric oxide mediates benefits of angiotensin II type 2 receptor overexpression during post-infarct remodeling. *Hypertension* 43: 680-685, 2004
 19. Hashimoto N, Maeshima Y, Satoh M, Odawara M, Sugiyama H, Kashihara N, Matsubara H, Yamasaki Y, Makino H. Overexpression of angiotensin type 2 receptor ameliorates glomerular injury in a mouse remnant kidney model. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: 516-525, 2004
- 分担研究者：室原豊明
20. Shintani S, Kusano K, Li M, Iwakura A, Heyd L, Curry C, Wecker A, Gavin M, Ma H, Kearney M, Silver M, Thorne T, Murohara T, Losordo DW. Synergistic effect of combined intramyocardial CD34 cells and VEGF-2 gene therapy after MI. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3:S1-S6, 2006
 21. Cheng XW, Kuzuya M, Nakamura K, Di Q, Liu Z, Sasaki T, Kanda S, Jin H, Shi GP, Murohara T, Yokota M, Iguchi A. Localization of cysteine protease, cathepsin S, to the surface of vascular smooth muscle cells by association with integrin $\alpha v \beta 3$. *Am J Pathol* 168: 685-694, 2006
 22. Taniguchi E, Kin M, Torimura T, Nakamura T, Kumemura M, Hanada S, Hisamoto T, Yoshida T, Kawaguchi T, Baba S, Maeyama M, Koga H, Harada M, Kumashiro R, Ueno T, Ikeda H, Imaizumi T, Murohara T, Sata M. Endothelial progenitor cell transplantation improves the outcome following liver injury in mice. *Gastroenterology* 130: 521-531, 2006
 23. Naruse K, Hamada Y, Nakashima E, Kato K, Mizubayashi R, Kamiya H, Yuzawa Y, Matsuo S, Murohara T, Matsubara T, Oiso Y, Nakamura J. Therapeutic neovascularization using cord

- blood-derived endothelial progenitor cells for diabetic neuropathy. *Diabetes* 54: 1823-1828, 2005
24. Izumi Y, Kim-Mitsuyama S, Yoshiyama M, Omura T, Shiota M, Matsuzawa A, Yukimura T, Murohara T, Takeya M, Ichijo H, Yoshikawa J, Iwao H. Important role of apoptosis signal-regulating kinase 1 in ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1877-1883, 2005
 25. Rookmaaker MB, Verhaar MC, Loomans CJM, Peters E, Murohara T, Staal FJT, van Zonneveld AJ, Koolwijk P, Rabelink TJ, van Hinsbergh VWM. CD34+ cells home, proliferate and participate in capillary formation and in combination with CD34- cells enhance tube formation in a 3D matrix. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 25: 1843-1850, 2005
 26. Lee M, Aoki M, Kondo T, Okumura K, Komori K, Murohara T. Therapeutic angiogenesis with intramuscular injection of low dose recombinant granulocyte-colony stimulating factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2535-2541, 2005
 27. Murohara T. Therapeutic angiogenesis: Cellular approach from bone marrow, cord blood and peripheral blood. *Int Congress Series* 1262: 332-338, 2004
 28. Higashi Y, Kimura M, Hara K, Noma K, Jituike D, Nakagawa K, Oshima T, Chayama K, Goto C, Matsubara H, Murohara T, Yoshizumi M. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia. *Circulation* 109: 1215-1218, 2004
 29. Kondo T, Hayashi M, Kinoshita K, Kobayashi K, Iino S, Inden Y, Murohara T. Smoking cessation rapidly increases endothelial progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1442-1447, 2004
 30. Murohara T, Ikeda H, Otsuka Y, Aoki M, Haramaki N, Katoh A, Takajo Y, Imaizumi T. Inhibition of platelet adherence to mononuclear cells by a-tocopherol: Role of P-selectin. *Circulation* 110: 141-148, 2004
 31. Shimada T, Takeshita Y, Murohara T, Sasaki K, Egami K, Shintani S, Katsuda Y, Ikeda H, Nabeshima Y, Imaizumi T. Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in precocious aging Klothomouse. *Circulation* 110: 1148-1155, 2004
 32. Choi JH, Hur J, Yoon CH, Kim JH, Lee CS, Youn SW, Oh IY, Skurk C, Murohara T, Park YB, Walsh K, Kim HS. Augmentation of therapeutic angiogenesis using genetically-modified human endothelial progenitor cells with altered glycogen synthase kinase-3b activity. *J Biol Chem* 279: 49430-49438, 2004
 33. Niiyama H, Kai H, Yamamoto T, Shimada T, Sasaki K, Murohara T, Egashira K, Imaizumi T. Roles of endogenous monocyte chemoattractant protein-1 in ischemia-induced neovascularization. *J Am Coll Cardiol* 44: 661-666, 2004
 34. Yamamoto K, Kondo T, Suzuki S, Izawa H, Kobayashi M, Emi N, Komori K, Naoe T, Takamatsu J, Murohara T. Molecular evaluation of endothelial progenitor cells in patients with ischemic limbs: therapeutic effect by stem cell transplantation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 192-196, 2004
 35. Imamura A, Okumura K, Matsui H, Mizuno T, Ogawa Y, Imai H, Numaguchi Y, Sakai K, Murohara T. Endothelial nitric oxide synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms are associated with endothelial dysfunction in young, healthy men. *Can J Cardiol* 20: 1229-1234, 2004
 36. Aoki M, Yasutake M, Murohara T. Derivation of functional endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood mononuclear cells isolated by a novel cell filtration device. *Stem Cells* 22: 994-1002, 2004
- 分担研究者： 冢田清次
37. Yoshio T, Onda K, Nara H, Minota S. Association of IgG Anti-NR2 glutamate receptor antibodies in cerebrospinal fluid with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 54:675-678,2006
 38. Nagashima T, Okazaki H, Yudoh K, Matsuno H, Minota S. Apoptosis of rheumatoid synovial cells by statins through the blocking of protein geranylgeranylation. *Arthritis Rheum* 54:579-586,2006
 39. Yoshio T, Hirata D, Onda K, Nara H, Minota S. Antiribosomal protein antibodies in cerebrospinal fluid are associated with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 32: 34-39, 2005
 40. Kamata Y, Kamimura T, Iwamoto M, Minota S. Comparable effects of sildenafil citrate and alprostadil on severe Raynaud's phenomenon in a patient with systemic sclerosis. *Clin Exp Dermatol* 30: 451, 2005

分担研究者：天野純

41. Yamaura K, Ito K, Tsukioka K, Wada Y, Makiuchi A, Sakaguchi M, Akashima T, Fujimori M, Sawa Y, Morishita R, Matsumoto K, Nakamura T, Suzuki J, Amano J, Isobe M. Suppression of acute and chronic rejection by hepatocyte growth factor in a murine model of cardiac transplantation. Induction of tolerance and prevention of cardiac allograft vasculopathy 109: 1650-1657, 2004
42. 福井大祐、天野純。四肢末梢動脈閉塞性疾患に対する外科治療の有用性と限界 循環器科 56: 36-41, 2004
43. 福井大祐、天野純、下平滋隆、池田宇一。四肢虚血性疾患に対する自己骨髄細胞移植とその臨床効果 治療学 39: 765-768, 2005
- 分担研究者：高橋将文
44. Yoshioka T, Takahashi M, Shiba Y, Suzuki C, Morimoto H, Izawa A, Ise H, Ikeda U. G-CSF Accelerates Reendothelialization and Reduces Neointimal Formation After Vascular Injury in Mice. Cardiovasc Res 70:61-69, 2006
45. Jia L, Takahashi M, Yoshioka T, Morimoto H, Ise H, Ikeda U. Therapeutic potential of endothelial progenitor cells for cardiovascular diseases. Current Vascular Pharmacology 4:59-65, 2006
46. Takahashi M, Takahashi S, Suzuki C, Jia L, Morimoto H, Ise H, Iwasaki T, Hattori H, Suzuki J, Miyamori I, Kobayashi E, Ikeda U. Interleukin-1 beta attenuates beta-very low-density lipoprotein uptake and its receptor expression in vascular smooth muscle cells. J Mol Cell Cardiol 38: 637-646, 2005
47. Kamiyoshi Y, Takahashi M, Yokoseki O, Yazaki Y, Hirose S, Morimoto H, Watanabe N, Kinoshita O, Hongo M, Ikeda U. Mycophenolate Mofetil Prevents the Development of Experimental Autoimmune Myocarditis. J Mol Cell Cardiol 39: 467-477, 2005
48. Yamaguchi Y, Kubo T, Murakami T, Takahashi M, Hakamata Y, Kobayashi E, Yoshida S, Hosokawa K, Yoshikawa K, Itami S. Bone marrow cells differentiate into wound myofibroblasts and accelerate the healing of wounds with exposed bones when combined with an occlusive dressing. Brit J Dermatol 152: 616-622, 2005
49. Shimizu H, Takahashi M, Kaneko T, Murakami T, Hakamata Y, Kudou S, Kishi T, Fukuchi K, Iwanami S, Kuriyama K, Yasue T, Enosawa S, Matsumoto K, Takeyoshi I, Morishita Y, Kobayashi E. KRP-203, a novel synthetic immunosuppressant, prolongs graft survival and attenuates chronic rejection in rat skin and heart allografts. Circulation 111: 222-229, 2005
50. Tahara K, Murakami T, Fujishiro J, Takahashi M, Inoue S, Hashizume K, Matsuno K, Kobayashi E. Regeneration of the rat neonatal intestine in transplantation. Ann Surg 242: 124-132, 2005
51. Sato Y, Matsui K, Ajiki T, Igarashi Y, Takahashi M, Murakami T, Hakamata Y, Tabata Y, Kobayashi E. Can a bone marrow cell contribute to organ regeneration? In vivo analysis using transgenic rats with reporter genes. Transplant Proc 37: 273-275, 2005
52. Inoue H, Ohsawa I, Murakami T, Kimura A, Hakamata Y, Sato Y, Kaneko T, Takahashi M, Okada T, Ozawa K, Francis J, Leone P, Kobayashi E. Development of new inbred transgenic strains of rats with LacZ or GFP. Biochem Biophys Res Commun 329: 288-295, 2005
53. Shimizu H, Takahashi M, Takeda S, Inoue S, Fujishiro J, Hakamata Y, Kaneko T, Murakami T, Takeuchi K, Takeyoshi I, Morishita Y, Kobayashi E. Mycophenolate mofetil prevents transplant arteriosclerosis by direct inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation. Transplantation 77: 1661-1667, 2004
54. 高橋将文、福井大祐、岩本雅弘、天野純、蓑田清次、室原豊明、松原弘明、池田宇一。自家骨髄単核球と血管再生療法（難治性血管炎） Pharma Medica 23: 33-36, 2005

G. 知的所有権の取得状況

特許出願 2004-209126

血中コレステロール低下作用物質

特許出願 2005-183614

N-アセチルグルコサミン糖鎖認識タンパク質

分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業） 分担研究報告書

「骨髄幹細胞移植による難治性血管炎への血管再生医療に関する 多施設共同研究」

分担研究者 松原 弘明

京都府立医科大学医学系研究科 循環器病態制御学 教授

I. 背景

従来成人における血管新生は、隣接する既存の毛細血管内皮細胞の増殖と遊走によるものと考えられてきた。しかし最近、成人末梢血中の単核球分画に血管内皮細胞に分化しうる内皮前駆細胞の存在が初めて報告された（Science, 1997;275: 964）。我々は、骨髄単核球細胞が内皮前駆細胞を末梢血中より豊富に含有し、さらには、強力な血管新生因子である血管内皮増殖因子（VEGF）や線維芽細胞増殖因子（FGF）を豊富に分泌することを発見した。また心筋梗塞や下肢虚血モデルにおいて虚血心筋・下肢骨格筋内への自己骨髄細胞移植が、血管新生を増強し、心機能改善や下肢血流量増加が誘導することを報告した（Circulation 2001;104:1046-1052, Circulation 2002;106: 2019-2025）。我々と久留米大学、自治医大が中心となって組織した多施設共同・二重盲検臨床試験（Therapeutic Angiogenesis

by Cell Transplantation; TACT）では、自家骨髄単核球の虚血下肢患者への筋肉内移植が有効な血管新生・虚血部血流増加を誘導することを世界で初めて発表した（Lancet 2002;360:427-435）。これらの科学的・臨床的根拠に基づき、2003年6月に厚生労働省は重症虚血下肢患者（閉塞性動脈硬化症・バージャー病）への当該治療を高度先進医療として保険適用の承認を行った。我々が行ってきた骨髄単核球細胞移植による虚血下肢への血管新生治療は既に国内で250人を超え、その先進的医療の有効性は国際的にも認知され循環器領域で初めての細胞移植医療として確立されつつある。京都府立医科大学においても重症虚血下肢患者への骨髄細胞移植治療を開始し、2005年4月に厚生労働省より高度先進医療認定病院の認定を受けている。

強皮症やその関連膠原病の中には微小血管障害や血管炎にもとづく血

流障害による難治性阻血指趾や難治性皮膚潰瘍を呈する患者が存在する。指趾または四肢切断に至る重傷例も報告されているが、これらの膠原病を背景とした難治性末梢性血管疾患に対する血流改善治療は未だ確立されていない。

II. 目的

膠原病による末梢性血管疾患に対して自己骨髄細胞の指趾または四肢筋肉内投与が、有望な血管新生療法として臨床レベルで応用可能かどうかを検証するために臨床研究を実施する。

III. 方法 (TACT プロトコールによる血管新生療法に準ずる)

1. 手技

1) 骨髄液採取および骨髄単核球細胞の分離：

虚血四肢の患者に対して手術室(全身麻酔)にて、腸骨よりそれぞれ500mlの骨髄液採取を行う。分離は輸血部において、比重遠心分離法にて骨髄単核球細胞を分離・濃縮する(血液内科・輸血部によってすでに臨床実施されている骨髄移植・分離法に完全に準じる)。

2) 下肢骨格筋への骨髄単核球細胞投与：C8病棟にて行う。上記の方法1)にて分離した骨髄単核球細胞を、骨髄細胞 10^8 個/0.3ml/1カ所の細胞数にて27G針を用いて虚血下肢骨格筋に約100カ所筋肉内注射を行う。患者さん

は覚醒下であるが、注射による疼痛緩和のため硬膜外チューブを挿入する。

2. 治療効果判定法

① 身体的所見：虚血性潰瘍は写真に撮影する。部位・深さ・壊死の形状を記録する。潰瘍の大きさは、長軸方向の最大長で評価する。足趾の間などの測定不能部位では表面面積を概算する。潰瘍の深さは、下記の基準による：1=表在欠損；2=皮下病変；3=腱もしくは骨の露出；4：腱もしくは骨の壊死、また、潰瘍は湿性か乾性であるかも評価する。

② ABI (ankle-brachial index)、Air Plethysmographyによる下肢血流量測定、下肢酸素分圧測定、トレッドミル(2km/h)、血管造影・MRI(MRA)にて側副血行路・血流再開を評価する。

③ 下肢疼痛レベルの評価：NSAIDで治療不可能な痛みをgrade 4、安静時疼痛がない状態をgrade 0とし、疼痛スケールを5段階で自己記録する。

④ QOLによる判定：申請者は、以下の方法を参考に可能な方法でQOLを評価する。① Scoring of status (residential status and ambulatory function)：Pomposelli F, J Vasc Surg 1998;28:215-25, ② SF-12 (Physical and mental health scores)：Ware J, 2nd ed. Boston: The Health Institute, New England Medical Center, 1995

3. 対象

1) 末梢性血管疾患（膠原病およびその類似疾患）：

Fontaine 分類 III 度および IV 度、Rutherford 慢性虚血肢臨床分類 II 度 4 群、III 度 5 群および 6 群に属し、安静時痛または虚血性潰瘍・壊死を有する患者で、内科的・外科的に血行再建術の適応が無く、将来切断が予想される患者。

2) 性別：男性および女性（妊娠中および妊娠の可能性のある女性を除く）

3) 年齢：原則として 20 歳以上 80 歳以下。

4) 適応除外事項：過去 3 ヶ月以内にアルコールもしくは薬物依存の既往のある患者、悪性新生物を有する患者及び 3 年以内にその既往のある患者、別途規定の諸検査により悪性腫瘍の

可能性があると判断された患者、未治療の糖尿病性網膜症を有する患者、インフォームドコンセントを得られない患者、その他、主治医が不相当と判断した患者。

別途規定：胸部 X 線、胸部 CT、腹部 CT、胃カメラ、大腸カメラ（省略すること有り）。

IV. 当施設における治療実績

平成 18 年 3 月までの治療実績は別表の通りである。

平成 17 年度における強皮症やその関連膠原病を背景とする難治性血管炎への血管再生医療に対する新規治療者はなかった。

TACT成績

Pt No	診断	Fontaine	年齢	性別	初回移植日	糖尿病	高脂血症	高血圧	mBP	透析	PTA	Bypass	PTA+Bypass	MNC ×10 ⁹	CD34 ×10 ⁶	移植肢数	ABI	TCO2	歩行距離	VAS
1	ASO	3	58	m	2003/9/17	-	+	-	100	なし	1	2	3	1.49	5.22	1	改善	改善	改善	改善
2-1	ASO	4	80	m	2004/2/18	+	-	+	99	あり	0	0	0	1.15	9.66	1	改善	改善	不変	不変
2-2	ASO	4	80	m	2004/6/9	+	-	+		あり	0	0	0	1.79	9.31	1	改善	改善	改善	不変
3	ASO	4	77	m	2004/3/17	-	-	+	102	なし	0	0	0	1.64	9.02	1	改善	不変	改善	改善
4	ASO	3	77	f	2004/4/28	+	+	-	78	なし	0	1	1	2.22	23.30	1	不変	不変	改善	改善
5	ASO	4	73	m	2004/6/23	+	+	+	97	なし	0	0	0	2.10	22.30	2	改善	改善	改善	改善
6	ASO	3	75	f	2004/9/29	+	+	+	97	なし	0	0	0	2.69	30.45	1	不変	不変	不変	改善
7	ASO	4	70	m	2004/11/27	+	-	+	87	なし	0	0	0	2.06	7.2	1	切断	切断	切断	切断
8	ASO	3	64	F	2005/7/27	+	+	+	87	あり	0	0	0	2.0		1	測定不能	改善	改善	改善
9	ASO	4	57	m	2005/11/23	+	-	+	109	あり	1	1	0	2.21	30.9	1	測定不能	改善	改善	改善
10	ASO	4	62	F	2006/1/19	-	+	-	90	なし	0	0	0	2.5		1	不変	改善	改善	改善
Ave.		3.6	70.27						95		0	0	0	1.98	16.38	1				
SD		0.5	8.63						9.0		0.4	0.7	0.9	0.44	10.31	0.3				
1	TAO	4	33	m	2004/3/3	-	-	-	76	なし	0	0	0	2.65	26.0	1	測定不能	測定不能	測定不能	測定不能
2	TAO	4	49	m	2004/6/30	-	-	-	96	なし	0	0	0	3.58	34.70	2	改善	改善	改善	改善
3	TAO	4	49	m	2005/2/23	-	-	-	98	なし	0	0	0	2.56	33.0	1	不変	改善	改善	改善
4	TAO	4	43	m	2005.4.19	-	-	-	101	なし	0	0	0	2.39		1	不変	改善	改善	改善
5	TAO	3	44	m	2005/4/27	-	-	-	88	なし	0	1	0	1.9		1	測定不能	改善	改善	改善
6	TAO	4	50	m	2005/9/28	-	-	-	83	なし	0	0	0	2.23		2	改善	改善	改善	改善
Ave.		3.8	44.67						90.3		0	0.2	0	2.6	31.2	1.3				
SD		0.4	6.41						9.8		0	0.4	0	0.6	4.6	0.5				

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業) 分担研究報告書

「骨髄幹細胞移植による難治性血管炎への血管再生医療に関する 多施設共同研究」

分担研究者 室原 豊明

名古屋大学大学院医学系研究科 循環器内科学 教授

I. 背景

閉塞性末梢動脈疾患(閉塞性動脈硬化症・バージャー病)の患者は、間欠性跛行・安静時疼痛・皮膚潰瘍・壊死などの症状を呈し、quality of life (QOL)が低下するだけでなく、重症虚血肢では切断に至る場合も多い。治療法としては、生活習慣の改善勧告、運動療法、薬物療法、カテーテルによる血管拡張術やバイパス術などの血行再建術が行われてきたが、動脈硬化病変が重症でありまた病変が末梢にあるなどのためにこれら従来の治療法が無効あるいは不可能な症例も少なくない。

このような症例に対して最近、虚血周辺の比較的健全な組織からの血管新生や側副血行の発達を人為的に促進し、虚血組織の修復・壊死を軽減させようとする試みがなされている。これらの一連の戦略は治療的血管新生(therapeutic angiogenesis)と呼ばれ、組織の虚血を改善するのみならず、機能を回復させる観点からも大変重要である。一方血管新生の促進は、腫瘍の増殖や転移巣の拡大、また増殖性糖尿病性網膜症、慢性関節リウマチの骨膜炎などに対しては病的に働く。これらの病的な血管新生と、虚血臓器にみられるような半ば生理的な血管新生の病態が同じものであるのか、あるいは異なった機序で起こるのかは完全には明らかにされていない。

II. 血管新生治療

現在虚血組織に対する血管新生療法としては、大きく2種類存在している。すなわち1)血管新生因子の蛋白や遺伝子治療を虚血部位あるいは静脈投与して血管新生を促す方法(血管増殖因子を用いた治療)、2)骨髄あるいは末梢血中に存在している幹細胞や血管内皮前駆細胞を用いた細胞療法である。1994年米国タフツ大学のIsnerらが血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor)を用いた臨床応用が開始し治療的血管新生(therapeutic angiogenesis)という概念を提唱して以来、虚血組織に対する血管新生治療の研究・開発が急速に進歩しはじめた。更に、成体において末梢血中に血管内皮細胞のもととなる血管内皮前駆細胞がCD34陽性細胞分画に多く存在すること、またこれらの細胞が骨髄細胞由来であることが報告されて以来、血管内皮前駆細胞あるいは前駆細胞を多く含む骨髄細胞を用いて血管新生治療が行えることを我々は明らかにし、2000年より世界に先駆けて骨髄単核球細胞移植による重症下肢虚血治療(Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation; TACT)が有効であることを報告してきた。その後、骨髄単核球細胞移植による治療は、現在高度先進医療として特定の認定施設では保険適応治療として行えるようになっている。

末梢血中や骨髄細胞中に存在している血管内皮前駆細胞は、もともと自己の細胞であり、安全性や特許などの問題点が少な

い。更に、我々はラットやウサギを用いた動物実験を繰り返し、骨髄単核球細胞移植が虚血部位の血管新生を促進し組織の虚血を改善することを確認してきた。そこで、自己骨髄単核球細胞移植は、従来の方法では血行再建不可能な重症下肢虚血の虚血を改善し機能の回復が期待できると判断し、倫理委員会に申請・承認後、2000年より自己骨髄単核球細胞移植による末梢閉塞性動脈疾患患者の血管新生療法に関する多施設臨床試験(TACT Study Group)を開始した。

本治療では、骨髄単核球細胞中に含まれる血管内皮前駆細胞(CD34陽性細胞など)の移植の効果のみならず同時に移植されるCD34陰性細胞からはVEGFやbFGFなどの血管増殖因子が分泌される。つまり、血管の基となる細胞の移植に加えて、血管新生因子も大量に虚血部位で放出されるため、両方の作用の相乗効果が得られることとなる。実際、TACT Studyでは、自己骨髄単核球細胞移植以外の方法として末梢血単核球細胞移植も検討を行っている。結果は、骨髄単核球細胞移植の方が末梢血単核球細胞移植より有効性が高いことも明らかとなった。VEGF、bFGF、Angiopoietin-1などの血管新生因子の分泌は骨髄単核球と末梢血単核球では差を認めず、治療効果の違いは血管内皮前駆細胞数の違いによるものと考えられた。

III. TACT プロトコールによる血管新生療法の実際

1. 適応

重症末梢閉塞性動脈疾患(閉塞性動脈硬化症・バージャー病)のために日常生活が著しく障害され、従来からの薬物療法など他のいかなる治療にも反応せず、かつ血管形成術やバイパス手術が不可能なために、今後回復が期待できない患者。さらに、説明文書にて十分に自己骨髄細胞移植で発生する合併症・効能・不利益・利益を説明し、患者自らの意志および家族の理解と承諾に基づいて、細胞移植医療を希望する場合のみ施行する。

2. 除外基準

- 合併する虚血性心疾患などのために骨髄採取の際の全身麻酔に耐えられない患者
- 合併症等により余命が1年以内と考えられる患者
- 過去3ヶ月以内にアルコールもしくは薬物依存の既往のある患者
- 悪性新生物を有する患者及び過去5年以内にその既往のある患者、および諸検査により悪性腫瘍の可能性が現在あると判断された患者(血管新生療法により腫瘍の増大や転移を促進する危険性がある)
- 重度の糖尿病性網膜症を有する患者(血管新生療法により網膜症が悪化する危険性がある)
- その他インフォームドコンセントを得られない患者や主治医が不適当と判断した患者

3. 方法

(1) 治療前検査

- ① 一般検査:問診、理学所見、検便、検尿、血液生化学、全血球数、単純胸腹部レントゲン、心電図など通常の入院時諸検査
- ② 悪性疾患のスクリーニング:便潜血、腫瘍マーカー「AFP、CEA、CA19-9、PSA(男性のみ)など」、乳腺撮影(女性のみ)、上部消化管透視、腹部超音波検査
- ③ 糖尿病性網膜症のスクリーニング:眼底検査
- ④ 血液疾患のスクリーニング:全血球数、末梢血液像等
- ⑤ 冠動脈疾患のスクリーニング:ジピリダモール負荷心筋血流核医学検査、陽性であれば冠動脈造影(治療)を行う

(2) 骨髄液採取および骨髄単核球細胞の分離

骨髄液採取2週間前までに、400mLの自己血貯血を行う。手術室にて全身麻酔下に腸骨より500mLから800mLの骨髄液を採取し、比重遠心分離法(AS.TEC 204, Fresenius社)にて骨髄単核球を分離を行う(全ての清潔操作方法、および抗生物質等の投与は、

すでに臨床実施されている骨髄移植法に準じる)。単核球分画は最終的には30-50mlの液に濃縮する。採取する細胞数としては、骨髄単核球としては、 $1 \times 10^9-10^{10}$ 細胞、CD34陽性細胞数としては、 1×10^7 細胞を目安としている。手術後に自己血輸血(400mL)を行う。

(3)骨格筋への骨髄または末梢血単核球細胞移植

骨髄液採取後、腰椎麻酔下で単核球(約 1×10^9 個)を26G針注射器を用いて虚血部下肢骨格筋に0.5mLずつ40-60カ所に分けて筋肉内に注射する。

(4)評価項目

- ① 視診:治療前、治療1、2、3、4週間後および6ヶ月後に視診可能な虚血性潰瘍は写真に撮影記録する。部位・深さ・壊死の形状を記録する。潰瘍の大きさは、長軸および短軸方向の最大長で評価する。足趾の間などの測定不能部位では表面面積を概算する。潰瘍の深さは、下記の基準による:1=表在欠損;2=皮下病変;3=腱もしくは骨の露出;4:腱もしくは骨の壊死、また、潰瘍部の感染の有無も評価する。
- ② ABI (ankle-brachial pressure index):治療前、治療1、2、3、4週間後および6ヶ月後に測定する。
- ③ レーザードップラーによる皮下血流および経皮的組織酸素分圧測定:治療前、治療1、2、3、4週間後および6ヶ月後に測定する。
- ④ DSA または経動脈的血管造影:治療前、治療4週間後および6ヶ月後に実施する。
- ⑤ 歩行距離測定:治療前、治療1、2、3、4週間後および6ヶ月後に歩行可能であれば、トレッドミルを用いて平地・2.4km/hの条件で最大跛行距離または疼痛出現までの歩行距離を測定する。
- ⑥ QOL:Visual analogue scale (10段階評価)による症状の変化を治療前、治療1、2、3、4週間後および6ヶ月後に評価する。

IV.当施設における治療実績

平成18年3月までの治療実績は別表(1~4)の通りである。

平成17年度における新規治療者はなかった。

現在6名を経過観察中である。

表1.患者背景

症例	年齢 (歳)	性別	診断名	虚血部位 / 状態	ABI	虚血肢に対する治療歴 (今回の治療対象肢以外の肢を含む)	既往歴
1	37	女性	パージヤー病	左第 I 趾 / 虚血性潰瘍	1.09	交感神経節切除術、薬物療法	虫垂炎、高脂血症、喫煙(15本/日・20年)
2	57	男性	閉塞性動脈硬化症	左第Ⅲ趾/ 虚血性潰瘍	0.56	薬物療法	20歳:痛風、43歳:慢性腎不全(痛風腎、血液透析導入)、45歳:閉塞性動脈硬化症(両下肢)、46歳:心筋梗塞(スリット留置術)、喫煙(20本/日)
3	58	男性	閉塞性動脈硬化症	右足 / 安静時痛	0.74	バイパス術、経皮的血管形成術、 右第Ⅱ・Ⅲ指左足切断術	33歳:糖尿病、40歳:慢性腎不全(糖尿病性腎症-血液透析導入)、50歳:狭心症(55歳:バイパス術)、51歳:閉塞性動脈硬化症(両側大腿膝窩バイパス術)、55歳:両側総腸骨動脈に血管形成術、58歳:右第Ⅱ・Ⅲ指左足切断術
4	67	男性	閉塞性動脈硬化症	右足 / 安静時痛	0.29	薬物療法	52歳:慢性腎不全(慢性糸球体腎炎、血液透析導入)、57歳:直腸良性腫瘍(人口肛門造設)、60歳:外傷性くも膜下出血、63歳:胆石・腸閉塞、65歳:閉塞性動脈硬化症
5	51	男性	パージヤー病	右第 I 趾 / 安静時痛	0.77	交感神経節切除術、薬物療法	44歳:糖尿病、46歳:パージヤー病(交感神経節切除術)、高脂血症、喫煙(20本/日・35年)
6	57	男性	閉塞性動脈硬化症	左 I II V 趾/ 壊死・虚血性潰瘍	0.20	薬物療法、右下腿切断術	40歳:慢性腎不全(血液透析導入)、53歳:大動脈弁狭窄症(弁置換術)、56歳:閉塞性動脈硬化症(57歳:右下腿切断)、57歳:腎動脈瘤破裂(塞栓術)
7	47	女性	パージヤー病	左足 / 安静時痛	0.00	交感神経節切除術、薬物療法	13歳:虫垂炎、44歳:子宮筋腫、喫煙(15本/日・15年)

表2.治療年月

症例	治療年月
1	2002年12月
2	2003年3月
3	2003年9月
4	2004年2月
5	2004年2月
6	2004年7月
7	2004年11月

表3.移植細胞数

症例	移植部位	移植総単核球数(個)	移植CD34陽性細胞数(個)
1	左・腓腹筋	3.7×10^9	3.0×10^7
2	左・腓腹筋	1.2×10^9	1.4×10^7
3*	右・腓腹筋	3.0×10^8	4.0×10^6
4	右・腓腹筋	2.8×10^9	3.3×10^7
5	右・腓腹筋	6.2×10^9	7.0×10^7
6	左・腓腹筋	1.6×10^9	2.1×10^7
7	左・腓腹筋、左・大腿四頭筋	9.0×10^9	1.9×10^7

*:薬物負荷心筋シンチグラムにて心筋虚血が疑われたため骨髄採取は行わず、末梢血単核球移植術を施行した。

表4.臨床経過

症例	4週後		長期経過	観察期間	
	自覚症状	ABI 経皮酸素分圧			
1	改善	不変	改善	ABI・経皮酸素分圧不変、潰瘍治癒、	39ヶ月
2	改善	不変	不変	ABI改善(0.56→0.89)、経皮酸素分圧不変、第ⅡⅢ趾切断(5週後・9ヵ月後)	36ヶ月
3	改善	不変	不変	安静時痛改善、ABI・経皮酸素分圧不変、突然死(5ヵ月後)	5ヶ月
4	不変	不変	不変	安静時痛・ABI・経皮酸素分圧不変、下腿切断(3ヵ月後)	25ヶ月
5	改善	不変	不変	ABI・経皮酸素分圧不変、疼痛再燃	25ヶ月
6	不変	不変	改善	安静時痛・ABI不変・経皮酸素分圧改善、下腿切断(6週後)	20ヶ月
7	改善*	不変	改善*	下腿切断(16日後)	16ヶ月

*:術後2週での評価

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

自己末梢血単核細胞分画を用いた繰り返し移植による
血管新生療法

分担研究者 簗田清次

研究協力者 釜田康行、岩本雅弘

自治医科大学 内科学講座 アレルギー膠原病学部門

【目的】

平成 15～16 年度に、我々は膠原病に伴う阻血指趾に対し、自己骨髓血単核細胞分画および自己末梢血単核細胞分画を、左右それぞれ異なる手掌（および足底）に単回移植を行い、数ヶ月間の自覚症状の改善を得た。また、その際骨髓血単核細胞分画移植側と末梢血単核細胞分画移植側とで自覚症状の改善に有意差を認めなかった。その理由として単回移植では効果が持続しないこと、および骨髓血単核細胞分画と末梢血単核細胞分画にはそれほど差がないのではないかと考えた。この経験をもとに平成 17 年度より膠原病に伴う阻血指趾に、自己末梢血単核細胞分画のみを 3 ヶ月毎に繰り返し移植することにより、①骨髓血単核細胞分画を使用した場合と比較してより侵襲の低い手技で同様の効果が得られるか、②持続的な自覚症状の改善効果を得ることができるか、③目視可能な新生血管を再生することができるか、④自覚症状等の改善に際して移植する CD34 陽性細胞の数や単核細胞の数に関与しているのか、

⑤1 箇所あたりの移植細胞数は少ないが単位面積当たりの移植箇所が多い場合と、単位面積当たりの移植箇所は少ないが、1 箇所当たりの移植細胞数が多い場合との効果の違いについて検討した。

【症例】

平成 17 年 6 月より 1 年間、3 例の膠原病に伴う阻血指趾に対して自己末梢血単核細胞分画の繰り返し移植を開始した。

症例 1 は、71 歳（年齢は移植開始時の年齢）男性。基礎疾患は CREST 症候群（罹病歴 14 年）、Raynaud 現象（罹病歴 19 年）である。症例 2 は、64 歳男性。基礎疾患は強皮症（罹病歴 10 年）、シェーグレン症候群（罹病歴 9 年）、間質性肺炎（罹病歴 3 年）、Raynaud 現象（罹病歴 6 年）。症例 3 は 60 歳男性。基礎疾患は混合性結合組織病（罹病歴 5 年）、Raynaud 現象（罹病歴 6 年）。いずれも、血管造影検査において血流が描出されない阻血指趾を有しており、既存の血管拡張薬では治療効果がなかった。

【方法】

末梢血単核細胞分画の移植を、各症例とも3ヶ月毎に行った。

各症例とも1回目(症例1のみ2回目も)の移植前日に、自己末梢血400mlを採取し(赤血球および血清は返血した)、比重遠心分離法により単核細胞分画を分離した。移植当日、単核細胞分画を20mlのRPMI培地に懸濁し、0.2mlずつ左右両手掌に各50箇所筋肉注射ないし骨膜下注射した。2回目以降(症例1のみ3回目以降)は、採取ならびに移植する単核細胞数(CD34陽性細胞数)を増量するため、移植前日に自己末梢血800mlを採取した(赤血球および血清は返血した)。2回目は、1回目の移植と同様に移植当日単核細胞分画を20mlのRPMI培地に懸濁し、0.2mlずつ左右両手掌に各50箇所筋肉注射ないし骨膜下注射した。3回目の移植からは、1箇所あたりに移植する細胞数をさらに増量するために、単核細胞分画を8mlのRPMI培地に懸濁し、0.4mlずつ潰瘍や自覚症状が強い左または右の側の手掌にのみ20箇所筋肉注射ないし骨膜下注射した(単位面積当たりの移植箇所を減らした)。

なお、3回目の移植は末梢血単核細胞分画の移植を、症例1は指尖潰瘍がある右手のみに、症例2は自覚症状が強い左手のみに、症例3は指尖潰瘍がより重症な右手のみに行った。

評価は、移植開始前と1年後に血管造影検査、移植後1ヶ月毎にサーモグラフィ検査およびVASスケールによる疼痛、冷感、満足度の

アンケート調査、健康調査QOL尺度SF-36により行った。

【結果】

平成17年度の研究では、下記表1~4および図1から図6までに示すような結果を得た。

【考察】

平成17年の自己末梢血単核細胞分画の繰り返し移植による血管新生療法では、自覚的にも他覚的にも有意な変化は見られなかった。しかし平成17年末より、単位面積当たりの移植箇所を減らし、1箇所当たりの移植細胞数を増加させたところ、症例1に見られていた指尖潰瘍が平成18年に入り冬季の気温が低い時期にありながら有意に改善し始め、4回目の移植前評価の時点で約8割程度の改善をみ、著効したと判断された。この結果から、単位面積当たりの移植箇所の密度よりは、移植部位1箇所あたりの移植細胞数を増加させることが有効である可能性が伺われた。この効果が移植するCD34陽性細胞の数や単核細胞の数に関与しているのか、単核細胞分画に含まれるサイトカインや移植に伴う炎症の惹起などが関与しているのかについては、1年間の最終評価が終了した後の検討課題である。

平成18年度は自己末梢血の採取量を800ml、移植部位を一側の手掌に20箇所として試験を継続する予定である。