

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相当と判断した患者

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）により骨髄単核球細胞の分離濃縮を行う（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）。単核球細胞分画は最終的には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

骨髓液採取後、腰椎麻酔下に分離濃縮した単核球細胞（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。

2007年我々は¹⁰⁾、昨年までに行った9名中7名の患者に対する治療効果判定を行った。安静時疼痛などの自覚症状および皮膚潰瘍面積や上肢下肢血圧比（ankle-brachial pressure index: ABI）やサーモグラフィーにより評価した皮膚表面温度といった客観的指標の双方とも改善を認めた症例群を治療反応群とし、自覚症状および客観的指標のどちらか一方もしくは双方とも改善が見られない群を治療非反応群とした。さらに、細胞移植後の末梢血中幹細胞数およびアンジオジェニックサイトカインの継時的変化を測定した。

結果：驚くべきことに、治療反応群はすべてバージャー病患者であり、慢性血液透析中である閉塞性動脈硬化症患者はすべて治療非反応群となった（図5）。自己骨髓単核球細胞移植治療後、治療非反応群に比して治療反応群においては、末梢流血中CD34陽性細胞数およびCD133陽性細胞数つまり末梢流血中EPC数が有意に持続的に増加していた（図6）。また、アンジオジェニックサイトカインである VEGF や bFGF の血清濃度は、治療反応群において移植前より持

症例	年齢	性別	診断名	ABI	自覚症状	TcO2	Thermography	Angiography
1	37	女性	Buerger病	1.09	著明改善	改善	不変	改善
2	57	男性	ASO	0.56	軽度改善	不変	不変	不変
3	58	男性	ASO	0.74	軽度改善	不変	不変	不変
4	67	男性	ASO	0.29	不変	不変	不変	NA
5	61	男性	Buerger病	0.77	著明改善	不変	改善	NA
6	57	男性	ASO	0.20	不変	改善	不変	NA
7	47	女性	Buerger病	0.00	軽度改善	改善	改善	NA

responders
non-responders

図5: 自己骨髓単核球細胞移植後の自覚症状、客観的指標の改善度

Kajiguchi, et al. Cir J. 2007.

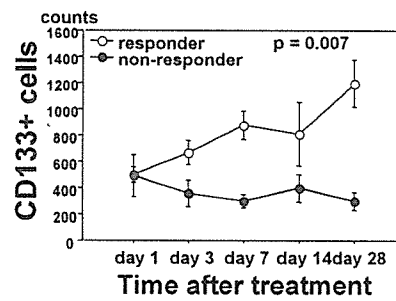
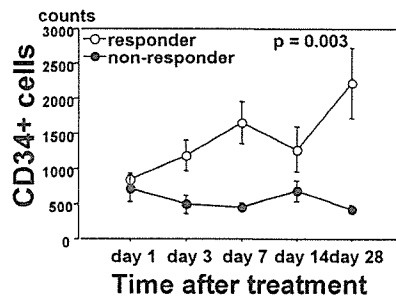
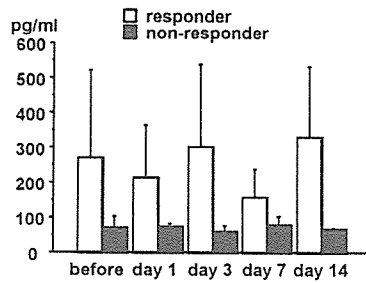


図6: 自己骨髄単核球細胞移植後の末梢流血中幹細胞数

Kajiguchi, *et al.* Cir J. 2007.

A. Serum VEGF Level



B. Serum bFGF Level

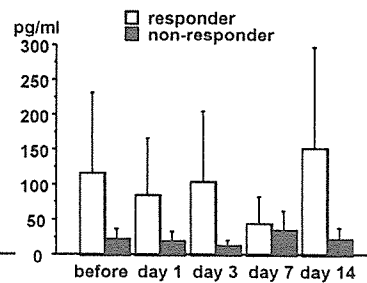


図7: 自己骨髄単核球細胞移植後の末梢血中サイトカイン濃度

Kajiguchi, *et al.* Cir J. 2007.

続的に高値であった（図7）。

考察：従来の治療法では下肢切断の回避が不可能である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）に対する血管新生療法を行ってきた。すべての患者が治療反応群となったバージャー病患者は自己骨髄単核球細胞移植治療後の、末梢血中のEPC数が持続的に増加しており、治療反応性の裏付け、或いは治療反応性を反映している可能性があると考えられた。一方、治療効果の乏しい症例は、全例慢性血液透析を受けているASO患者であり、長期間の血液透析による血管内皮機能の障害やEPC数/機能の減弱、NOの生理活性低下などが、治療反応性や術後の血中EPC数推移の差異の一因と考えられた。さらに、VEGFやbFGFといったアンジオジェニックサイトカインの血清濃度は、治療反応群では、血管新生療法前より増加傾向がみられており、治療適応基準を決定する因子となる可能性は高い。本検討は、少人数での検討であり、より多数例での検討が必要であるが、TACT-1 multi-center study -interim report-（2000年7月から2003年10月までの全国17施設における治療成績の中間解析）で報告されているように、重症例の中には本治療でも改善困難な患者群が存在し、糖尿病患者ではABI>0.1以上の改善は46%であり、また透析患者では33%の治療有効性しかみられなかった。このことに関し、我々を含め他施設から興味深い報告がでてくる。多くの動脈硬化危険因子を有する患者^{12,13}、特に喫煙患者¹⁴）においては健常人と比較し末梢流血中のEPC数の不足のみならず細胞機能が低下していた。さらに、慢性虚血性心筋症患者¹⁵）では、健常人と比較し骨髄単核球細胞分画中のEPC数は変わらないが、EPCの内皮細胞としての機能（コロニー形成能、遊走能、血管新生能）が低下していた。これが現行の細胞移植による血管新生療法の限界点となっている可能性は高く、様々な施設で治療効果減弱の要因を解決すべく新たな血管新生療法の開発が行われている。

結語：自己骨髄単核球細胞移植による血管新生療法は、基礎疾患により治療効果に違いがみら

れた。細胞移植治療後の末梢血中幹細胞数の推移やアンジオジェニックサイトカインは、治療反応性の裏付け、或いは治療反応性を反映している可能性があると考えられた。重症例の中には本治療でも改善困難な患者群が存在し、また透析患者では治療抵抗性である事が判明した。今後、慢性透析合併ASO症例など多くの動脈硬化危険因子を有する治療抵抗性症例への治療適応基準の検討や新たな血管新生療法の開発が望まれる。今回、我々の検討では、末梢流血中アンジオジェニックサイトカインの血清濃度が、治療適応基準を決定する一因子となる可能性が示唆された。現在、我々は、更なる治療適応疾患の拡大を行っており、慢性虚血性心筋障害患者に対する冠動脈バイパス術とのハイブリッド治療を展開している¹⁶）。

参考文献

1. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964-967, 1997
2. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Sasaki K, Duan J, Imaizumi T. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 103: 897-903, 2001
3. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, & Imaizumi T. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cell: a pilot study and a randomized controlled trial. *Lancet* 360: 427-435, 2002
4. Risau W, Sariola H, Zerwes HG, Sasse J, Eklom P, Kemler R, Doetschman T. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic stem cell-derived embryoid bodies. *Development* 102: 471-478, 1988.
5. Flamme I, Risau W. Induction of vasculogenesis and hemotopoiesis in vitro. *Development* 116: 435-439, 1992.
6. Risau W. Vasculogenesis, angiogenesis and

- endothelial cell differentiation during embryonic development. In Feinberg RN, Sherer GK, Auerbach R (Eds) *The development of the vascular system* 14: 58-68, 1991
7. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med.* 133:275-288, 1971
 8. Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, Rosenfield K, Razvi S, Walsh K, Symes JF. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet* 348: 370-374, 1996
 9. Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 105: 1527-1536, 2000
 10. Fahey JL, Sarna G, Gale RP, Seeger R. Immune interventions in disease. *Ann Intern Med* 106:257,1987.
 11. Kajiguchi M, Kondo T, Izawa H, Kobayashi M, Yamamoto K, Shintani S, Numaguchi Y, Naoe T, Takamatsu J, Komori K, Murohara T. Safety and efficacy of autologous progenitor cell transplantation for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia. *Circ J* 71: 196-201, 2007
 12. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease *Circ Res* 89: E1-E7, 2001
 13. Hill JM, Zalos G, Halcox JPj, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk *N Engl J Med* 348: 593-600, 2003
 14. Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, Numaguchi Y, Kobayashi K, Iino S, Inden Y, Murohara T. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:1442-1447, 2004
 15. Heeschen C, Lehmann R, Honold J, Assmus B, Aicher A, Walter DH, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease *Circulation* 109: 1615-1622, 2004
 16. Izawa H, Kondo T, Usui A, Yamamoto K, Shintani S, Inden Y, Isobe S, Unno K, Kajiguchi M, Kato T, Nodo A, Okumura K, Naoe T, Takamatsu J, Komori K, Ueda Y, Murohara T. Clinical protocol for angiogenesis by intramyocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells in patient with severe coronary artery disease -TACT-NAGOYA-HEART- *Circ J* 70: 1180-1183, 2006

「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」

膠原病に起因した阻血指趾に対する自己末梢血単核細胞を用いた 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

背景

膠原病では、四肢末端の血流障害に伴うレイノー現象や指尖潰瘍などの虚血症状がしばしば見られる。この血流障害は、主に血管内皮の障害や細胞増生による細動脈の狭窄や閉塞に起因している。膠原病に伴う血管障害は、著しい冷感と疼痛を伴い、進行すると潰瘍や壊疽をきたし指趾切断に至ることもある¹⁾。

膠原病に伴う血管障害の治療法としては、Ca拮抗剤、prostaglandin製剤^{2,3,4)}などの血管拡張剤が用いられてきたが、奏効する例は少なく重症例に対する有効な治療法がないのが現状である。

2002年、Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation (TACT) studyにおいて、慢性動脈閉塞症患者（閉塞性動脈硬化症、バージャー病）の虚血肢に自己骨髄単核細胞分画の単回移植を行い、良好な成績が報告された⁵⁾。そこで我々は、TACT studyと同様の方法により、6症例の膠原病に起因する阻血指趾に対し、自己骨髄血単核細胞分画および自己末梢血単核細胞分画を単回移植し、1年間評価を行い、その有効性について検討した。その結果、膠原病に起因した阻血指趾に対しては、移植する細胞として自己骨髄血単核細胞分画と自己末梢血単核細胞分画との間で効果に差が無いこと、またその効果に長期間の持続性が無いことを見出した⁶⁾。

目的

膠原病に起因する難治性の阻血指趾に対し、より患者負担の少ない自己末梢血単核細胞分画を用い、より高い効果を得るべく繰り返し移植を行い、その効果と安全性について検討を行った。

症例

Case 1は、73歳男性。CREST症候群（罹病期間15年）、レイノー現象（発症後20年）、シェーグレン症候群（罹病期間2年）。血管拡張薬投与下においても四肢末端の進行性の疼痛、潰瘍を認めていた。Case 2は、65歳男性。全身性強皮症（罹病期間10年）、シェーグレン症候群（罹病期間9年）、間質性肺炎（罹病期間3年）、レイノー現象（発症後6年）。血管拡張薬投与下においても両手指の疼痛、冷感を認めていた。Case 3は、61歳男性。混合性結合組織病（罹病期間5年）、レイノー現象（発症後6年）、間質性肺炎（罹病期間7年）。血管拡張薬投与下においても両手指の疼痛、指尖に繰り返す潰瘍、壊疽を認めていた。

方法

自己末梢血単核細胞分画を用いた繰り返し移植は、3ヶ月毎に計4回行った。各症例とも1回目（Case 1のみ1および2回目）の移植前日に、

自己末梢血400mlを採取し、比重遠心分離法により単核細胞分画を分離した（赤血球および血清は返血した）。移植当日、単核細胞分画を20mlのRPMI培地に懸濁したものを、0.2mlずつ両手掌に各50ヶ所ずつ筋肉内および骨膜下に注射した。2回目以降Case 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）を増量する目的で、移植前日に自己末梢血800ml（Case 3の4回目は1600mlを2日間で採取した）を採取した（赤血球および血清は返血した）。移植は、1回目と同様に移植当日に単核細胞分画を20mlのRPMI培地に懸濁し、0.2mlずつ両手掌に各50ヶ所ずつ筋肉内および骨膜下に注射した。3回目の移植からは、1ヶ所あたりに移植する単核細胞数（CD34陽性細胞数）をさらに増量する目的で、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側の手掌にのみ20ヶ所筋肉内および骨膜下に注射した（単位面積あたりの移植部位を減らした）。なお、3回目の移植は末梢血単核細胞分画の移植を、Case 1に対しては指尖潰瘍がある右手のみに、Case 2に対しては自覚症状が強い左手のみに、Case 3に対しては指尖潰瘍がより重症な右手のみに行った（表1）。

効果判定は、VAS（Visual Analog Scale）による疼痛、冷感、満足度の調査、および健康調査QOL尺度SF-36による調査を移植開始前と移植後1ヶ月毎に計13回行った。また、手足末梢皮膚表面温度をサーモグラフィーを用いて測定した。外観の評価は、移植前と移植後3ヶ月ごとに計5回写真により比較評価した。また、血管造影により描出血管の評価を移植前と移植1年後に行った。

結 果

自己末梢血単核細胞分画を用いた繰り返し移植療法では、末梢血から抽出された単核細胞は平均 6.1×10^8 であり（表2）、うちCD34陽性細胞は平均 0.25×10^6 含まれていた（表3）。

疼痛の評価（Pain VAS）では、Case 1, 3では指尖潰瘍の出現や増悪と一致してVASは悪化したが、移植部位を両手から潰瘍のある右手のみに

した3回目の移植以降は、潰瘍の治癒と共にVASの著明な改善を認めた（図1A）。Case 2は移植開始前から1年後の移植終了時まで疼痛を感じたことはなかった。冷感の評価（Feeling cold VAS）では、全症例で4回目の移植以降著明にVASが改善し、全ての症例で移植開始前と比較して1年後にはVASの改善を認めた（図1B）。

満足度の評価（Satisfaction VAS）では、Case 1と3に関しては、指尖潰瘍の悪化や出現と共にVAS増悪したが、指尖潰瘍改善と共にVASの改善を認めた（移植部位を両手から片手に減らした3回目の移植以降、全症例でVASの改善傾向を認めた）。健康調査QOL尺度SF-36による調査は、全症例で移植開始前と比較してQOLの上昇を認めた。

サーモグラフィーによる指尖部皮膚表面温度の評価では、Case 1および3では、指尖部皮膚温度の低下と共に指尖潰瘍が出現および悪化し、指尖部皮膚温度の改善と共に指尖潰瘍が治癒した。Case 2では、指尖部皮膚温度の上昇と共に自覚症状の改善が見られ、その後指尖部皮膚温度が低下しても自覚症状の悪化は見られなかった（図1C）。

外観の評価では、Case 1では2回目の移植後に新たな指尖潰瘍が出現し（右第2指に2ヶ所）、Case 3は移植開始前より指尖潰瘍があったが（右第1、3指）、2回目の移植後に悪化した。しかし、両症例とも4回目の移植後には潰瘍は治癒した。Case 2は、明らかな潰瘍は出現しなかったが、手指の色調が3回目の移植以降に変化し始め、4回目の移植終了後には明らかな改善がみられた（白色から肌色へ）。

血管造影による評価では、Case 2で移植開始前と比べ移植1年後で描出される血管が明らかに増加した。他の症例では移植開始前と移植1年後との間で明らかな変化を認めなかった。

考 察

末梢血単核細胞分画の繰り返し移植療法の結果より、骨髄血単核細胞分画を使用せず、末梢血単核細胞分画の移植のみで指尖潰瘍、疼痛、および冷感を改善する効果があることが確認さ

れた。また、3回目の移植以降に自・他覚症状の明らかな改善が見られ始めたことから、繰り返し移植し続けることにより効果を発現する可能性、または1ヶ所あたりに、または1指趾あたりに移植する単核細胞の数に依存する可能性が推測された（具体的には一側の手掌あたり 4×10^8 程度以上単核細胞を移植することにより、効果が得られる可能性が推測された）。

単核細胞分画の採取は、骨髓血と比較して末梢血の場合、患者負担が極めて少なく、また骨髓血を移植した場合と同等以上の効果が得られることから、骨髓血単核細胞分画移植に代わる新たな治療法となり得る可能性が示唆された。また、最長約2年間の経過観察を行っているが、現在までに血管新生術に起因すると考えられる副作用は見られておらず、安全性が高い治療法であると考えられた。

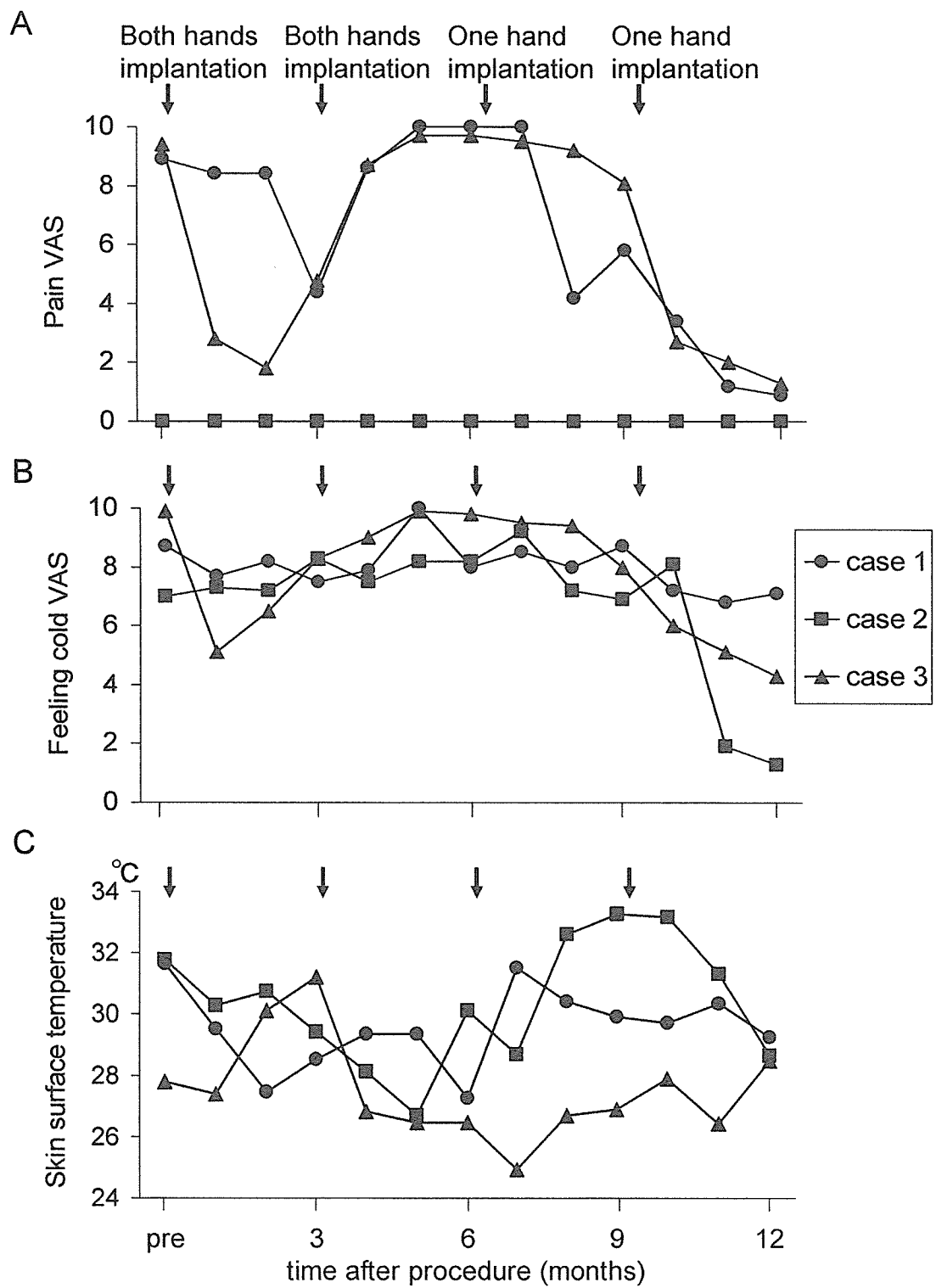
平成18年末より、自己末梢血単核細胞分画を用いた繰り返し移植療法に改良を加え、より患者負担の少ない方法で現在10例目の症例について血管新生療法を施行中である。

文 献

1. Wollersheim H, VanZwieten PA: Treatment of Raynaud's phenomenon: Euro Heart J 14: 147-149, 1993
2. Malamet R, Wise RA, Ettinger WH, Wigley FM: Nifedipine in the treatment of Raynaud's phenomenon. Am J Med 78: 602-608, 1985
3. Martin MF, Dowd PM, Ring EF, Cooke ED, Dieppe PA, Kirby JD: Prostaglandin E1 infusions for vascular insufficiency in progressive systemic sclerosis. Ann Rheum Dis 40: 350-354, 1981
4. Vayssairat M: Controlled multicenter double blind trial of an oral analog of prostacyclin in the treatment of primary Raynaud's phenomenon. French microcirculation society multicentre group for the study of vascular acrosyndromes. J Rheumatol 23: 1917-1920, 1996
5. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada

K, Iwasaki T, Imaizumi T: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. Lancet 360: 427-435, 2002

6. Kamata Y, Takahashi Y, Iwamoto M, Matsui K, Murakami Y, Muroi K, Ikeda U, Shimada K, Yoshio T, Okazaki H, Minota S: Local implantation of autologous mononuclear cells from bone marrow and peripheral blood for treatment of ischaemic digits in patients with connective tissue diseases. Rheumatology (in press)



↑ 図1の説明

図1: Aは単核細胞分画を移植した両手または片手の疼痛 (Pain VAS) の移植開始前から移植1年後までの変化、Bは単核細胞分画を移植した両手または片手の冷感 (Feeling cold VAS) の移植開始前から移植1年後までの変化、Cは単核細胞分画を移植した両手または片手のサーモグラフィーによる指尖部皮膚表面温度の移植開始前から移植1年後までの変化を示したグラフである。

表 1 自己末梢血単核細胞分画を用いた繰り返し移植療法における1~4回目の移植時の末梢血単核細胞分画移植部位

	第1回目移植	第2回目移植	第3回目移植	第4回目移植
Case 1	両手掌 100ヶ所	両手掌 100ヶ所	右手掌 20ヶ所	右手掌 20ヶ所
Case 2	両手掌 100ヶ所	両手掌 100ヶ所	左手掌 20ヶ所	左手掌 20ヶ所
Case 3	両手掌 100ヶ所	両手掌 100ヶ所	右手掌 20ヶ所	右手掌 20ヶ所

表 2 自己末梢血単核細胞分画を用いた繰り返し移植療法において移植した総単核細胞数

	第1回目移植	第2回目移植	第3回目移植	第4回目移植
Case 1	$3.16 \times 10^8 / 400\text{ml}$ $0.0316 \times 10^8 / 1\text{ヶ所}$	$4.80 \times 10^8 / 400\text{ml}$ $0.0480 \times 10^8 / 1\text{ヶ所}$	$11.04 \times 10^8 / 800\text{ml}$ $0.552 \times 10^8 / 1\text{ヶ所}$	$5.3 \times 10^8 / 800\text{ml}$ $0.265 \times 10^8 / 1\text{ヶ所}$
Case 2	$8.90 \times 10^8 / 400\text{ml}$ $0.089 \times 10^8 / 1\text{ヶ所}$	$6.60 \times 10^8 / 800\text{ml}$ $0.066 \times 10^8 / 1\text{ヶ所}$	$9.40 \times 10^8 / 800\text{ml}$ $0.470 \times 10^8 / 1\text{ヶ所}$	$6.44 \times 10^8 / 800\text{ml}$ $0.322 \times 10^8 / 1\text{ヶ所}$
Case 3	$2.20 \times 10^8 / 400\text{ml}$ $0.022 \times 10^8 / 1\text{ヶ所}$	$3.78 \times 10^8 / 800\text{ml}$ $0.0378 \times 10^8 / 1\text{ヶ所}$	$4.54 \times 10^8 / 800\text{ml}$ $0.227 \times 10^8 / 1\text{ヶ所}$	$6.46 \times 10^8 / 1600\text{ml}$ $0.323 \times 10^8 / 1\text{ヶ所}$

表 3 自己末梢血単核細胞分画を用いた繰り返し移植療法において移植したCD34陽性細胞数

	第1回目移植	第2回目移植	第3回目移植	第4回目移植
Case 1	$0.06 \times 10^6 / 400\text{ml}$ $0.0006 \times 10^6 / 1\text{ヶ所}$	$0.309 \times 10^6 / 400\text{ml}$ $0.0031 \times 10^6 / 1\text{ヶ所}$	$0.379 \times 10^6 / 800\text{ml}$ $0.0190 \times 10^6 / 1\text{ヶ所}$	$0.154 \times 10^6 / 800\text{ml}$ $0.0077 \times 10^6 / 1\text{ヶ所}$
Case 2	$0.270 \times 10^6 / 400\text{ml}$ $0.0027 \times 10^6 / 1\text{ヶ所}$	$0.260 \times 10^6 / 800\text{ml}$ $0.0026 \times 10^6 / 1\text{ヶ所}$	$0.387 \times 10^6 / 800\text{ml}$ $0.0194 \times 10^6 / 1\text{ヶ所}$	$0.351 \times 10^6 / 800\text{ml}$ $0.0176 \times 10^6 / 1\text{ヶ所}$
Case 3	$0.110 \times 10^6 / 400\text{ml}$ $0.0011 \times 10^6 / 1\text{ヶ所}$	$0.195 \times 10^6 / 800\text{ml}$ $0.0019 \times 10^6 / 1\text{ヶ所}$	$0.278 \times 10^6 / 800\text{ml}$ $0.0139 \times 10^6 / 1\text{ヶ所}$	$0.290 \times 10^6 / 1600\text{ml}$ $0.0145 \times 10^6 / 1\text{ヶ所}$

「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 天野 純

研究協力者 福井大祐¹、和田有子¹、越川めぐみ²、池田宇一²

信州大学附属病院 先端心臓血管病センター

心臓血管外科¹、循環器内科²

信州大学では、従来の内科的・外科的治療法では症状改善が困難と判断される重症虚血肢に対し、平成15年11月より平成18年3月までに自己骨髄細胞移植による血管再生療法を19例に対し施行してきた。平成18年度の一年間に1症例に対し本治療を施行し、累積移植症例数は20例となった(表1)。

対象疾患について

信州大学における平成17年度以降の閉塞性動脈硬化症の治療症例は、全例とも血管内治療ないし外科的治療にて治療され、自己骨髄細胞移植を施行した症例はなかった。このため、平成17年度以降に自己骨髄細胞移植を施行した8例は、Buerger病を含めた難治性血管炎症例のみで、平成18年度に移植を施行した1例はBuerger病の再移植症例であった。このため、平成17年度の報告書にて問題点としてあげた透析症例やBuerger病を除いた膠原病や抗リン脂質抗体症候群等の難治性血管炎に対する移植術についての考察は、平成18年度において進んでいない。

治療成績

平成16年度の本班会議において、平成16年度までに信州大学において自己骨髄細胞移植を行い、その時点で効果を評価し得ていた10例全例に症状の改善を得たことを報告した。自己骨髄細胞移植の効果は、これまで同様に潰瘍の縮小や治癒、安静時痛の消失などの症状の変化およびサーモグラフィーの変化、DPIの変動、動脈

造影検査所見などの他覚的検査により行っている。平成17年度は、効果を評価し得ている移植症例7例中4例で有効、3例で無効であった。無効であった3例はともにこれまでに自己骨髄細胞移植行ってきた症例と比べると移植の適応に苦慮する症例であった。さらに、平成18年度に移植を施行した症例は再移植症例1例であったが、結果は無効であった。移植有効例は20例中16例で奏功率は80%となった(表1)。

症例20 57歳・女性 Buerger病

信州大学における第12例目の自己骨髄細胞移植症例であり、今回2回目の移植を施行した。前回移植は両側上肢・左下肢の3肢に対し行い著効を得たが、今回は、前回移植を行わなかった右下肢症状の虚血性病変の増悪を認めたため患者の強い希望により右下肢1肢に対する再移植となった。移植の時点ですでに足部の壊疽を認め、踵部皮膚潰瘍を合併しており足部切断は不可避の状態、踵部の温存を目的とした移植となった。結果は無効であった。

無効症例の検討

当科における移植無効例の4例は全例ともに症状の増悪期において移植を行った症例であった。さらに2例は再移植例であった。また、3例は足指潰瘍ではなく、下腿や踵部に飛び石状の潰瘍形成を認める症例であった。

自己骨髄細胞移植の治療効果機序へのアプローチ

移植症例における血清中の血管新生関連因子の発現は、炎症又はBM-MNCsの移植によりAMやVCAM-1の発現が亢進され、移植細胞のアポトーシスの抑制や細胞接着に関する移植細胞による直接作用であると考えられる早期反応群と、新生血管の構築に参与するVEGF、bFGF、

NOやG-CSFなどの血管新生因子の分泌に関する移植細胞による間接的なパラクライン作用であると考えられる後期反応群の2つの時期が存在することが確認された。

表1

case	age	sex	disease	Fontaine分類	Clinical results
1	62	M	Buerger	IV	effective
2	30	M	Buerger	IV	effective
3	71	M	ASO	III	effective
4	41	F	PXE	III	effective
5	46	M	Buerger	II	effective
6	44	M	Buerger	II	effective
7	60	F	ASO	IV	effective
8	31	M	Buerger	IV	effective
9	36	F	PSS	III	effective
10	38	M	Buerger	IV	effective
11	55	M	Buerger	IV	effective
12	56	F	Buerger	IV	effective
13	49	M	Buerger	IV	effective
14	30	M	Buerger	III	effective
15	62	F	CREST	IV	not effective
16	45	M	Buerger	IV	effective
17	64	M	Buerger	III	not effective
18	49	M	Buerger	III	not effective
19	29	F	APS	IV	not effective*
20	57	F	Buerger	IV	not effective

「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」

骨髄細胞移植による血管再生の機序の解明および治療効果の 改善に関する研究

分担研究者 相澤義房¹

研究協力者 鳥羽 健²、加藤公則³

新潟大学医歯学総合研究科 教授¹、講師²、助手³

研究要旨

骨髄細胞移植による血管再生治療における再生の機序は不明点が多い。我々は体外での血管新生培養を用いた共培養実験で、造血幹細胞から得られた赤芽球コロニーの強い血管新生作用を認めた。マウス下肢虚血モデルを用いた骨髄細胞移植による治療実験でも、赤芽球が血管再生に重要であった。そこでエリスロポエチンを併用すると血管再生効果は向上した。その誘導体であるアジアロエリスロポエチンは多血症誘発作用が低く、骨髄細胞移植との併用効果が高かった。アジアロエリスロポエチンには強い血管新生作用が認められ、臨床応用に期待が持てると考えられた。

A. 研究目的

骨髄での赤血球系造血において、赤血球は遊走能がないことから、末梢血管に動員されるためには特別なシステムが存在すると推測され、細胞集塊表面へ向けて新生血管がこの發育することが想定される。そこで、赤芽球による新生血管の誘導能と、エリスロポエチンおよびその誘導体の血管新生作用を検討した。

B. 研究方法

1. 健康人骨髄細胞を赤芽球およびそれ以外の細胞に分離し、血管増殖因子群の発現プロファ

イルを観察した。2. 健康人末梢血造血幹細胞よりセミソリッド培養でGM系白血球コロニーおよび赤芽球コロニーを作成し、これを HUVEC を用いた血管新生培養系に添加/共培養することで、骨髄造血に伴う血管新生を再現し観察した。3. マウス下肢虚血モデルの骨髄細胞移植治療実験を用いて血管新生に必要な骨髄細胞分画の同定を行った。4. 同じモデルを用い、エリスロポエチンおよびアジアロエリスロポエチンの単独投与またはBMIとの併用による血管新生効果を観察した。健常マウスを用いてエリスロポエチンおよびアジアロエリスロポエチンの造血作用を比較した。

C. 研究結果

1. *de novo* のヒト骨髄細胞にはPLGF以外の因子が恒常的に発現していたが、PLGFは赤芽球にのみ発現していた。ヒト末梢血幹細胞よりセミソリッド培養で作成した CFU-GM および BFU-e でも、PLGF は BFU-e でのみ発現していた。骨髄細胞で VEGF を主に産生しているのは赤芽球であり、PLGF は赤芽球から分泌されていた。

2. コンフルエントな線維芽細胞上での HUVECによる血管チューブの形成を観察すると、ヒト末梢血幹細胞より作成したBFU-eには強い血管新生作用があったがCFU-GMにはこの作用がなかった。BFU-eの血管新生効果

は可溶性VEGFR 1 およびVEGFR 2 の添加によって阻害され、VEGF-A/PLGFの分泌による作用が重要であった。

3. マウス下肢虚血モデルを作成し、骨髓細胞移植 (BMI) およびEPOのin vivo作用を、血流の改善・虚血筋の組織・虚血下肢の生存を指標として観察した。6 日後の血流改善効果、組織血管数では BMI+EPO > BMI単独 = EPO単独 > 無治療であった。骨髓細胞から赤芽球のみを除いて移植すると下肢の生存効果は消失した。
4. 健常マウスにEPOまたはアシアロEPO (AsEPO) を投与すると、EPOには用量依存性の造血作用があるが、アシアロEPOは造血作用を示さず血管新生作用を示した。

D. 考察

骨髓細胞のうち、血管新生を誘導する主たる細胞は骨髓赤芽球であり、おそらく血管増殖因子の分泌を介した作用であると推測された。しかし赤芽球による血管新生において、骨髓CD14陽性細胞が果たす役割などは不明である。また、エリスロポエチンは165個のポリペプチドからなる糖タンパクで、3 つのN型および1 つのO型付加による炭水化物を結合している。生体内において分子の疲労・老化の結果としてアシアロエリスロポエチンが生じるが、シアル酸が脱落してガラクトースが露出すると等電点の逆転により陽性荷電を生じ、エリスロポエチン受容体 (陰性荷電) との親和性が著しく上昇する。人工的に作成したアシアロエリスロポエチンは、その標的臓器の 1 つである骨髓組織内に到達しがたく造血活性を欠いた。しかしアシアロエリスロポエチンは強い血管新生作用を示し、この点において臨床上有用であると思われる。その利点の追求と外部投与した場合の抗原性などを検討する必要がある。

E. 結論

骨髓細胞移植による血管新生の機序に、赤芽球がCD14陽性細胞の補助により、血管増殖因子を分泌することが推測された。アシアロエリスロポエチンは、血管新生用新薬としての期待を抱かせるものではあるが、その臨床応用には

慎重な検討が必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ozawa T他. Erythroid cells play essential roles in angiogenesis by bone marrow cell implantation. *J Mol Cell Cardiol.* 40: 629-638, 2006.
2. Mitsuma W他. Cardioprotective effects of recombinant human erythropoietin in rats with experimental autoimmune myocarditis. *Biochem Biophys Res Commun.* 344: 987-994, 2006.
3. Ozawa T他. Marked decrease of plasma VEGF after implantation of autologous bone marrow mononuclear cells in a patient with critical limb ischemia -a case report-. *Angiology.* 57: 235-239, 2006.

2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

「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」

膠原病・リウマチ性疾患における血管新生療法の検討

分担研究者 石ヶ坪良明
研究協力者 小林 弘、井畑 敦、上田敦久、大野 滋、岳野光洋
横浜市立大学病態免疫制御内科

研究要旨

近年、動脈硬化に伴う血行障害肢や虚血性心疾患に対する新しい治療法として自己骨髄幹細胞移植による血管新生療法の有用性が実証された。私どもは、膠原病・リウマチ性疾患に併発する難治性の四肢虚血病変を対象にして同療法を施行している。今回の血管新生療法対象5症例も、デブリドマンと同時に、外用剤、リポ化プロスタグランディンE1製剤等の治療にて改善が認められなかった難治症例である。

方法としては、腸骨より骨髄液を約400ml採取し、単核球 $1\sim 3\times 10^9$ cellsを分離精製後、虚血肢骨格筋内に投与した。

結果は、いずれの症例においても、術後2~4週後の経過で潰瘍は縮小およびVASの改善が認められた。体表皮膚温の上昇がサーモグラフィーで確認され、血流量の増加がレーザードップラー脈波計にて確認された。毛細血管顕微鏡で、消失していた爪上皮毛細血管の血流が観察され、動脈造影でも血流改善が認められた。なお、術前、術後の経過中、重篤な有害事象は認められなかった。今後、強皮症のみならず、他の膠原病・リウマチ性疾患へ血管新生療法の適応を拡大し、治療データを蓄積するとともに、治療前後で得られた臨床検体を用いた治療効果予測などについても検証を行っていく予定である。

A. 研究目的

近年、末梢動脈閉塞症（閉塞性動脈硬化症・Buerger病）患者への自己骨髄幹細胞による血管

新生療法（虚血部への筋肉内注入）が施行され、血行障害肢に対する新しい治療法としてその有用性がTACT study（therapeutic angiogenesis by cell transplantation）において実証された。一方、全身性炎症性疾患であり膠原病・リウマチ性疾患（関節リウマチ・全身性エリテマトーデス・全身性強皮症・血管炎症候群など）においても、しばしば血管の炎症に伴う諸臓器の重篤な血行障害を来す。特に全身性強皮症における血行障害は比較的頻度が高くレイノー現象はほぼ必発であり、主として微小循環、時に小動脈が障害される。四肢虚血による疼痛、皮膚潰瘍や壊疽は患者のQuality of Life（QOL）を著しく低下させ、ステロイド薬や免疫抑制薬のほか、抗凝固療法、血管拡張療法、局所感染対策などが奏功しない場合、不幸にも四肢切断に至る症例も経験する。このような症例に対して、血管新生促進因子やその遺伝子治療はいまだ十分に有効性が示されておらず、自己骨髄幹細胞による血管新生療法の有用性が期待されている。しかしながら、膠原病・リウマチ性疾患においてはその背景に免疫異常があり、血管新生療法が免疫異常に与える影響が不明な理由からこれまでに十分な検討はされていない。また、全身性強皮症について、病態論として、血清中のVEGF濃度は、健常対照に比して高濃度に存在しているにも関わらず、循環血管内皮前駆細胞が少なく、分化能が低下していることが報告されている。今回、私どもは、膠原病・リウマチ性疾患における四肢虚血病変に対して、自己骨髄幹細胞を用

いた血管新生療法を施行し、その認容性および有効性について検討したので報告する。

B. 研究方法

<対象>

膠原病・リウマチ性疾患自身の活動性はコントロールされているが、四肢のいずれかに虚血性潰瘍を合併する症例のなかで、従来の血行改善薬や局所軟膏処置にて潰瘍の改善が認められない症例を対象とした。なお、対象年齢は、20歳以上75歳未満で、性別は問わず、下記は適応除外基準とした。合併症などのために余命が1年未満と考えられるもの、過去3ヶ月以内に薬物やアルコール依存の既往があるもの、活動性のある糖尿病性網膜症を有するもの、5年以内に悪性新生物の既往を有するかスクリーニング検査によりその可能性があるかと判断されたもの、1年以内に虚血性心疾患や脳血管障害の既往のあるもの、心、肺、造血器などに重篤な臓器病変がある場合。また、本研究は横浜市立大学医学部倫理委員会の承認を得ており、本研究に関する十分な説明が同意説明文書をもとに行われ、その主旨を理解し文書による同意が得られた症例に対して施行された。術前スクリーニング検査として、血液検査、尿検査、便潜血検査、胸部および腹部X線写真撮影、心エコー、胸部および腹部CT検査、頭部MRI検査等を行い、全身麻酔に伴うリスクを評価するとともに、除外対象となる虚血心疾患、脳血管障害、糖尿病性網膜症、悪性新生物等を検索した。

<手術方法および効果判定>

移植2週間前にプロスタサイクリン以外の抗血小板薬を中止し、自己血400mlを貯血した。骨髓液は、バイオクリーンのある手術室で採取し、全身麻酔下（一例は、肺繊維症合併のため麻酔科医の判断で腰椎麻酔および硬膜外麻酔）に伏臥位とし、両側腸骨稜から採取した400～500mlの骨髓液を、ヘパリン添加したRPMI培地中へ浮遊させた。Bone Marrow Collection Kitを用いて骨髓液中の脂肪塊や骨片などを除去後、Cobe Spectra血液成分分離装置を用いた密度勾配遠心分離により骨髓単核球を分離後、1500回転10分間遠心し、上清を吸引し合計25mlの細胞浮遊液に調整した。このうち20mlを移植

用検体とし、1mlシリンジ40本に0.5mlずつ分注し、21G針で筋肉内に40箇所等間隔に注入した。残りの5mlは、有核細胞数、生細胞率およびCD34陽性細胞数の解析および凍結保存用とした。有核細胞数の測定は血球計算機LH755を使用、CD34測定にはclassIII epitopeを認識するFITC標識モノクローナル抗体clone581を用いて算出した。移植前および移植後2週、4週、12週、24週、48週その後は12週毎に、問診（Visual analog scale (VAS)、SHAQ、レイノー現象の有無など）、身体所見（皮膚潰瘍の大きさ、深さ、性状を観察し、デジタルカメラで写真撮影）、ABI、サーモグラフィー、パルスドップラー、毛細血管顕微鏡などのデータを解析した。サーモグラフィーは、室温23℃の環境下、10分間の馴化時間後に測定した。また経動脈性digital subtraction angiography (IA-DSA)による末梢動脈の評価は、移植前および移植8週後に施行したが、静脈相出現の時相で末梢動脈の造影について比較した。

C. 研究結果

本研究に参加した症例は、アメリカリウマチ学会の全身性強皮症分類基準を満たす全身性強皮症5例である。平均年齢60.8歳（50～72歳）、全て女性であった。全身性強皮症と診断後、平均14.6年（5～22年）の罹病期間であった。5例中4例は抗セントロメア抗体陽性で、逆流性食道炎3例、原発性胆汁性肝硬変1例、肺線維症1例の合併症が認められた。2症例に副腎ステロイド薬が使用されていたが、いずれも10mg/日未満の少量であった。皮膚硬化の程度を示すmodified Rodnan total skin score (mRodnanTSS)の平均値は18.8点と比較的高い数値を示し、全例で著明なレイノー現象を認めた。潰瘍部位は上肢指尖部4例、下肢足底部1例で、深さはいずれも真皮層におよび、大きさは平均74.6mm²であった。前治療としては、創のデブリドマンや軟膏処置、リポ化プスタグランジンE1製剤の静注療法などが施行され、潰瘍形成から血管新生療法までの平均罹病期間は7.5ヶ月であった。移植後、全例で皮膚潰瘍は軽快し上皮化した。比較的潰瘍が浅く、潰瘍径が小さいものは、移植後数日で乾性となり、2週間後には潰瘍は縮小

傾向を示し、8 週後には上皮化した。また足底に生じた深い潰瘍は、完全な上皮化までは24週を要した。また、移植後変化として、これまで停止していた爪の伸張が認められた。潰瘍の縮小とともに、VAS の軽減が認められた。皮膚硬化については、移植後、皮膚が柔らかくなったと感じる症例も認めたが、皮膚硬化の客観的な評価法である mRodnanTSS の経過は不変で、QOL の指標である sHAQ も変化を認めなかった。レイノー現象に関しては、移植後アイスクリームを持ってもレイノー現象を認めなかった症例や、移植した肢が温かく感じた症例も認めた。採取した骨髓液量および骨髓細胞数の平均値は、それぞれ 419 ± 39 mlおよび $8.79 \pm 2.82 \times 10^9$ cellsで、血液成分分離回収後の骨髓単核球数は $3.77 \pm 1.53 \times 10^9$ cellsであった。更に、フローサイトメトリーによる解析の結果、実際に一患肢あたり移植した生細胞数の平均値は、 $2.08 \pm 0.95 \times 10^9$ cellsであり、このうちCD34陽性細胞は、 $4.69 \pm 2.46 \times 10^7$ cellsであった。移植前後の体表温度の変化はサーモグラフィーを用いて検討した。症例 2 は、左第 3 指に皮膚潰瘍を認めたが指尖に近いほど体表温度は低下していた。移植後、体表温度が低い領域は減少した。体表温度の上昇が血流の増加に起因するか否かを確認するために、レーザードップラーを用いて血流量の変化を測定した。移植後に血流量は約 2 倍に増加した。また、皮膚潰瘍を認めた左 3 指の移植前後のレーザードップラー波形は、移植前には認められなかった脈波が移植後に認められるようになった。移植前後の患肢体表温度や血流量の増加が毛細血管レベルの微小循環の改善に起因するか否か評価する目的で、毛細血管顕微鏡による爪上皮毛細血管を観察した。皮膚潰瘍を形成した右第 2 指では、移植前は、毛細血管が殆ど認められなかったが、移植 2 週後には、ゴマ塩状の毛細血管が認められ、血管内に血流も観察されるようになった。潰瘍が認められない右第 5 指でも、強皮症の特徴である毛細血管の著明な蛇行および一部狭小化や拡張が認められた。移植前後の患肢体表温度や血流量の増加が、中小動脈レベルでの血流の改善に起因するか否かを検討するために、移植前後で、IA-DSA を施行した。移植前は、尺骨動脈は完

全に閉塞し描出されず、指尖部に潰瘍を形成した右第 2 指へ向かう固有掌側指動脈も途絶していた。移植後は、側副血行路形成に伴う血管網の増加を認め、尺骨側にも側副血行路の形成が認められた。移植後の経過観察期間中 (6 ヶ月～2 年 6 ヶ月)、移植前に認めた皮膚潰瘍は全例で上皮化した。手術直後に眩暈、咽頭痛がそれぞれ一症例ずつ認められたが、経過とともに自然軽快した。その他の重篤な有害事象は、術中術後ともに現在まで認めていない。移植を施行した同側肢に新しい潰瘍を生じた一症例を認めたが (最初の潰瘍部より異なる指)、移植前、移植 2 ヶ月後および潰瘍再発時期の IA-DSA の結果を比較すると、本症例の側副血行路はさらに増加しており、潰瘍が再発した手指の固有掌側指動脈の途絶が認められ再発の原因と考えられた。また、術後 6 ヶ月経過後移植肢は順調であったが、非移植肢に血流障害に伴う小潰瘍を一症例で認めた。血管新生療法を勧めたが、同意が得られず、リポ化 PGE1 製剤などの静注などにより経過観察していたが 12 ヶ月後に壊疽となった。

D. 考察

難治性の虚血性四肢皮膚潰瘍を併発した全身性強皮症 5 症例に対し自己骨髓幹細胞移植による血管新生療法を施行した。その結果、比較的早期の疼痛の軽減および潰瘍の治癒が認められ、リウマチ・膠原病疾患である全身性強皮症に対しての血管新生療法の有効性が認められた。術前術後でサーモグラフィーやレーザードップラーを用いた客観的評価により虚血肢の皮膚温の上昇、血流量の増加を認めたこと、さらに、毛細血管顕微鏡や血管造影により、毛細血管レベルでの血流の改善、中小動脈を連結する側副血行路の増加が観察されたことなどから有効であることは間違いない。血管新生療法を施行した症例のなかで、2 例の再発例が認められた。症例 2 は非移植肢に壊疽が生じ、症例 3 は移植した同側の手指に新しい潰瘍が生じた。しかし、症例 3 は再発時の血管造影所見から再発の原因が固有掌側動脈の途絶によるものであり、術前と比較して側副血行路は形成されていることを確認している。骨髓機能の回復を待っ

て2回目の移植を施行し新しく生じた潰瘍は改善した。血管新生療法が一定の期間の後に複数回の移植も十分可能である。

近年、全身性強皮症の病態として、循環血管内皮前駆細胞の減少や分化能の低下の重要性が報告されている。今回の症例の中にもCD34陽性細胞率が低下している症例も認められたが、その他の症例は、健常ドナーをはじめ Buerger 病や閉塞性動脈硬化症症例の陽性率との差は認められず、内皮前駆細胞の減少や分化能の低下は潰瘍の治癒機転への影響は少ないと考えられる。

概して、膠原病・リウマチ性疾患においては、皮膚潰瘍以外に全身的な臓器病変を併発していることが多く、全身麻酔を含めて血管新生療法自身が与える身体的影響はもちろん、術後の疾患活動性の可能性にも十分配慮する必要がある。その点、症例5は全身性強皮症に肺線維症を併発していたが、全身麻酔の代わりに腰椎および硬膜外麻酔を用いて施行し、リスクとして考えられる肺線維症の増悪など術後の併発症は認めなかった。しかしながら、膠原病リウマチ性疾患における臓器病変は多岐にわたり、程度も症例により多様であることから、血管新生療法の安全性に関する評価のためには今後の症例の蓄積が必要である。

E. 結論

全身性強皮症に併発した難治性虚血性皮膚潰瘍に対して自己骨髄幹細胞移植による血管新生療法は、安全性、認容性に問題なく、新たな治療手段と成り得ることが示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

学会発表

第50回 日本リウマチ学会総会・学術集会

2006年4月23日～26日 会場 長崎ブリックホール他 ワークショップW080-5

強皮症の皮膚潰瘍に対する自己骨髄細胞による

血管新生療法の有用性

小林 弘、関口章子、井畑 淳、泉二恭輔、上

H. 知的財産権の出願、登録状況
特になし

「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」

重症難治性虚血肢に対する血管新生療法

— 自己骨髄細胞移植及び DDS 徐放化蛋白を中心とした総合的治療戦略 —

分担研究者 宮本 正章

日本医科大学第一内科 准教授

研究要旨： 現行のいかなる内科的及び外科的治療法でも治癒しない(no optional patients)重症難治性虚血肢（バージャー病，ASO，糖尿病潰瘍・壊疽，PSS）41例，重症冠動脈性疾患（狭心症，虚血性心筋症）10例に対して自己骨髄細胞移植による血管再生療法を施行し，その有効性及び安全性を示した． ^{99m}Tc -tetrofosmine（TF）perfusion scintigraphy 等による種々の評価法により，4週以後良好な血流増加を証明し，疼痛の消失，緩和，QOLの著明な改善をもたらした．さらに重症難治性潰瘍・壊疽に対して医療用無菌ウジ治療（MDT）を導入した．これらの複合的治療法は，limb salvageのための新しい戦略となりうると考えられた．

A. 研究目的

現行のいかなる内科的及び外科的治療法でも治癒しない（no optional patients）重症難治性虚血肢（バージャー病，ASO，糖尿病潰瘍・壊疽，PSS）に対する自己骨髄細胞移植による血管再生療法及び医療用無菌ウジ治療（MDT）の有効性を証明する．

B. 研究方法

全身麻酔下に腹臥位にて両側腸骨より骨髄細胞液500 mlを採取した． $500\mu\text{l}$ 及び $200\mu\text{l}$ のフィルター後，血液分離装置AS TEC 204を使用して，骨髄単核球と血小板の細胞層を採取し，最終収量は，60-80 mlに濃縮された．直ちに24-

27G シリンジで虚血下肢及び debridement 後の潰瘍周辺に筋注した．

（倫理面への配慮）

日本医科大学付属病院倫理委員会及び日本医科大学倫理委員会の承認を受け，その適応に関しては各科（6科8人）よりなる血管再生適応評価委員会において1症例毎の適応を選択した．

C. 研究結果

Fontaine 分類では，91%がⅠ度(30/33例)を占め，糖尿病は52%（17/33例）が合併していた．視覚的アナログ（visual analog scale：VAS）にて定量的に検討したが，術前 74.2 ± 16.3 (mm) に対して術後4週で 14.9 ± 11.7 (mm) と著明に低下していた ($p < 0.0001$)．ABIは，術前 0.60 ± 0.29 から術後4週で 0.73 ± 0.27 ($p = 0.001$) と改善した．術前歩行可能で測定可能であった症例での treadmill test における無痛歩行時間は，術前 140 ± 53 秒から術後4週で 451 ± 74 秒と大幅に改善した． ($p = 0.034$)

D. 考察

本療法の結果，全例で疼痛が除去或いは軽減されたが．33例中5例では，術後2年以内に患肢切断を余儀なくされた．

本治療法の有効性を評価するため，客観的でもしかも定量化可能な評価法は難しい．PAD患者9人（潰瘍症例8例）を用いて患者をBMI後下肢切断に至った群（group A, n=3）と、切断を回避出来た群（group N, n=6）の2群に分類

した。術前と術後4週にankle-brachial index (ABI), 経皮酸素分圧 (TcPO₂) 及びTcTFシンチグラフィを用いた血流評価を行い2群間で比較した。術前と比較した術後4週の変化はABIとTc-TFでは2群間で有意な差を認めなかった: ABI (group A) 0.3±0.4 → 0.4±0.3, (group N) 0.5±0.3 → 0.5±0.1, NS; Tc-TF (group A) 0.4±0.2 → 0.7±0.2, (group N) 0.8±0.2 → 1.0±0.3, NS。一方、TcPO₂はgroup Nで有意に増加(23.2±7.9 → 40.3±10.8 torr)したが、group Aでは有意に低下(12.7±15.3 → 7.7±9.9 torr, p<0.05)した。BMI術前と比較した術後4週におけるTCPO₂の変化は重症PAD患者における下肢切断の予後予測因子として有用な検査法と考えられた。

E. 結論

現行のいかなる内科的及び外科的治療法でも治癒しない重症難治性虚血肢(バージャー病, ASO, 糖尿病潰瘍・壊疽, PSS) 41例, 重症冠動脈性疾患(狭心症, 虚血性心筋症) 10例に対して自己骨髄幹細胞移植による血管再生療法を施行し, その有効性及び安全性を示した。99mTc-tetrofosmine(TF) perfusion scintigraphy等による種々の評価法により, 4週後良好な血流増加を証明し(平均15%), 疼痛の消失, 緩和, QOLの著明な改善をもたらした。本治療法は, limb salvageのための新しい戦略となりうると考えられた。

F. 健康危険情報

本療法の副作用に関連して, 2例で筋注部位の局所的炎症(発赤, 腫脹, 軽度熱感)があったが, 7日以内に発赤は全て消失した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takagi Ikuyo, Nejima Jun, Takagi Genand Teruo Takano. Chronic Direct Stimulation of Adenylyl Cyclase Induces Cardiac Desensitization to Catecholamine and Beta-Adrenergic Receptor Downregulation in Rabbits. J Cardiovasc Pharmacol 48: 223-229, 2006.
- 2) Tara Shuhei, Miyamoto Masaaki, Asoh Sadamitsu, et al. Transduction of the anti-apoptotic

PTD-FNK protein improves the efficiency of transplantation of bone marrow mononuclear. J Mol Cell Cardiol 42: 489-497, 2007

- 3) 藤本啓志, 宮本正章, 高木 元 他
医療用ウジを用いた多剤耐性緑膿菌(MDRP)感染糖尿病性壊疽の治療
糖尿病 49: 517-523, 2006
- 4) 宮本正章 分担翻訳 Chapter 8 : Non-ulcerative pathologies Managing the Diabetic Foot, 2nd edition 糖尿病足病変研究会 2006 シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社
- 5) 水野博司, 赤石論史, 宮本正章 他
虚血性難治性皮膚潰瘍に対する骨髄単核球導入コラーゲンマトリックスの臨床応用 日本形成外科学会誌 26, 726-731, 2006
- 6) 高木 元, 宮本正章, 安武正弘 難治性虚血肢に対する自己骨髄幹細胞移植血管再生治療 リウマチ科 276-281 2006

2. 学会発表

- 1) Masaaki Miyamoto Excellent combination therapy of maggot debridement therapy (MDT) and bioartificial dermis with therapeutic angiogenesis and/or autograft skin transplantation 6th International Congress of Dipterology 2006
- 2) 宮本正章, 水野博司, 百束比古 他 第15回日本形成外科学会基礎学術集会 シンポジウム 2006
- 3) 宮本正章, 安武正弘 他 第31回日本外科系連合学会総会 シンポジウム2006
- 4) Gen Takagi, Masaaki Miyamoto, et al Control-Released Basic Fibroblast Growth Factor in Patients with Peripheral Artery Disease: Comparison with Bone Marrow Mononuclear Cell Implantation. AHA 2006

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

なし

1. 実用新案登録

なし

2. その他

なし