

「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
横浜市立大学大学院医学研究科病態免疫制御内科
横浜市立大学附属総合医療センター病院*

要旨

膠原病・リウマチ性疾患は、全身性炎症性疾患であるが、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。そのなかで、四肢虚血による疼痛、潰瘍や壊疽は患者のQOLを著しく低下させるが、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、局所感染対策などの治療が奏功しない場合には不幸にも四肢切断に至る場合もある。

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ジン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。

1. 緒言

従来、成人における血管新生は、既存の成熟血管内皮細胞の増殖と遊走によるものだけであるとされてきたが、成人の末梢血中には、血管内皮細胞 (endothelial cell:EC) に分化しうる血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell:EPC) が存在することが明らかになった^(1,2)。また種々の動物実験により、成人の血管新生においても、胎生期に見られるような血管発生型の血管新生 (angiogenesis) が関与している可能性が示唆されている^(3,4)。これらの血管内皮前駆細胞は骨髄より動員されると考えられており^(5,6)、実際に骨髄細胞移植によって虚血組織の血管新生を誘導できることが報告されている⁽⁷⁾。

このような、基礎研究に基づき、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⁽⁸⁾。

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^(9,10,11)。

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⁽¹²⁾、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。

近年、全身性強皮症についての研究が進み、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^(13,14)、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⁽¹⁵⁾。また、新たな治療戦略の一つとして、血管内皮前駆細胞の動員にstatinなどの有用性が検討されている⁽¹⁶⁾。

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。

2. 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。

<術前検査>

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>

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。骨髄液は、バイオクリーンのある手術室で採取し、初回穿刺の骨髄液は細胞数計測とライトギムザ染色標本を作製した。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の骨髄液を、ヘパリン添加したRPMI培地(培地500mlあたりヘパリン10000単位)中へ浮遊させた。Bone Marrow Collection Kit(Baxter)を用いて骨髄液中の脂肪塊や骨片などを除去後、術前の貯血自己血400mlと骨髄液を混合し、自動血球計算機にて赤血球数およびヘマトクリット値を測定した。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髄単核球を分離後、1500回転10分間遠心し(KUBOTA遠心機)、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（フローサイトメトリー法：Stem-Kit法－ISHAGEガイドライン準拠）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(BECKMAN COULTER社)を用いて2回測定しその平均値を算出した。

<治療効果判定>

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ーを解析した。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。

3. 結果、

3-1. 各症例の臨床的特徴

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例であり、その臨床的特徴は表1の通りである。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。

3-2. 皮膚潰瘍の性状および移植後の経過

血管新生療法を施行した症例の皮膚潰瘍の性状を図1に示す。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、図2に示すように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。皮膚潰瘍の治癒経過と疼痛の指標であるVASの関係を図3に示すが、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られたが、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。

3-3. 骨髄細胞数およびCD34陽性率の解析

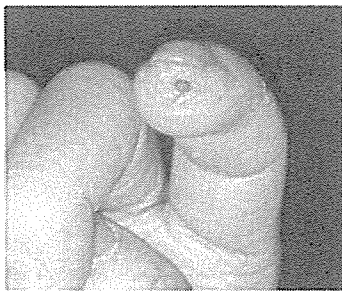
採取した骨髄液量および骨髄細胞数の平均値は、それぞれ419±39 mlおよび $8.79 \pm 2.82 \times 10^9$ cellsで、血液成分分離回収後の骨髄単核球数は $3.77 \pm 1.53 \times 10^9$ cellsであった。更に、フローサイトメトリーによる解析の結果、実際に一患肢あたり移植した生細胞数の平均値は、 $2.08 \pm 0.95 \times 10^9$ cellsであり、このうちCD34陽性細胞は、 $4.69 \pm 2.46 \times 10^7$ cellsであった。

3-4. サーモグラフィー、レーザードップラー脈波計による体表温度および血流量の検討

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（図5A白矢印）。移植後（図5B）、

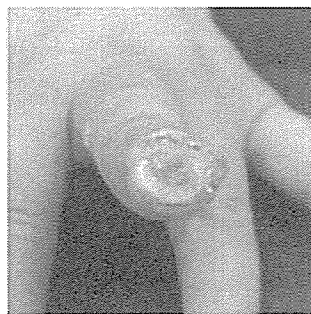
図1-1. 血管新生療法の対象となった皮膚潰瘍

症例1 63歳 女性



部位 右第2指
大きさ 7 mm x 6 mm
深さ 真皮層
潰瘍形成期間 3.5ヶ月

症例2 50歳 女性



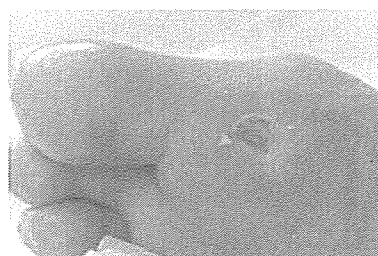
部位 左第3指
大きさ 15 mm x 10 mm
深さ 真皮層
潰瘍形成期間 4ヶ月

症例3 57歳 女性



部位 右第2指
大きさ 10 mm x 10 mm
深さ 真皮層
潰瘍形成期間 6ヶ月

症例4 72歳 女性

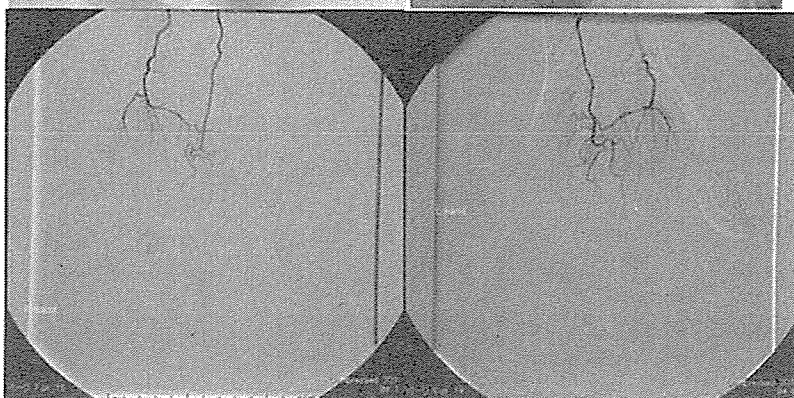
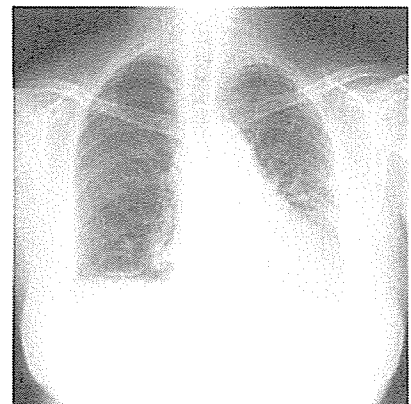
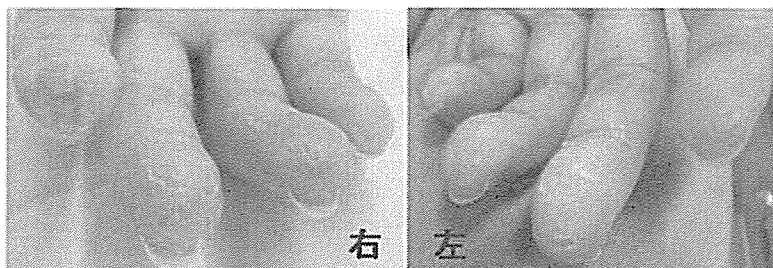


部位 右足底
大きさ 8 mm x 10 mm
深さ 真皮層
潰瘍形成期間 15ヶ月

図1-2. 血管新生療法の対象となった皮膚潰瘍

症例5 64歳 女性

部位 右第2指
大きさ 3 mm x 5 mm
深さ 真皮層
潰瘍形成期間 8ヶ月



麻酔 : 腰椎+硬膜外
+フェンタネスト

図2-1. 血管新生療法施行後の皮膚潰瘍の経過

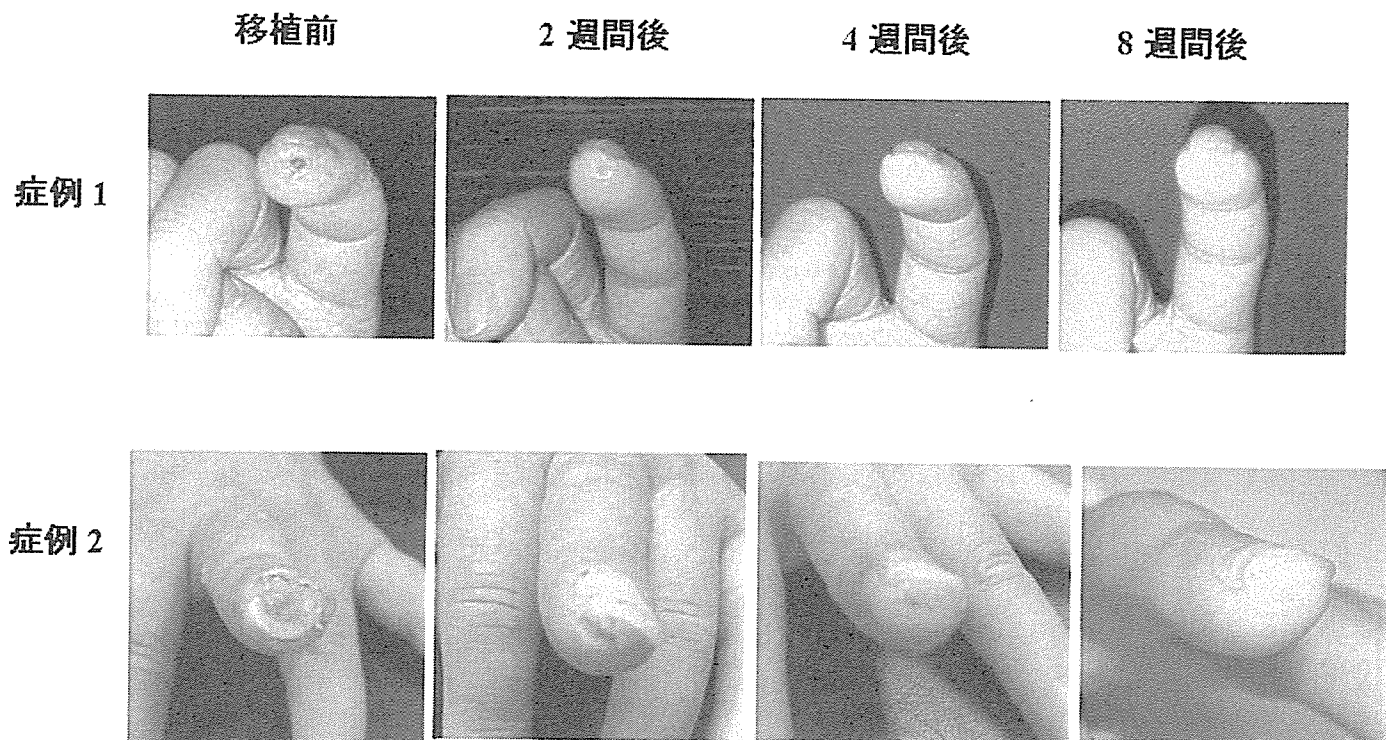


図2-2. 血管新生療法施行後の皮膚潰瘍の経過

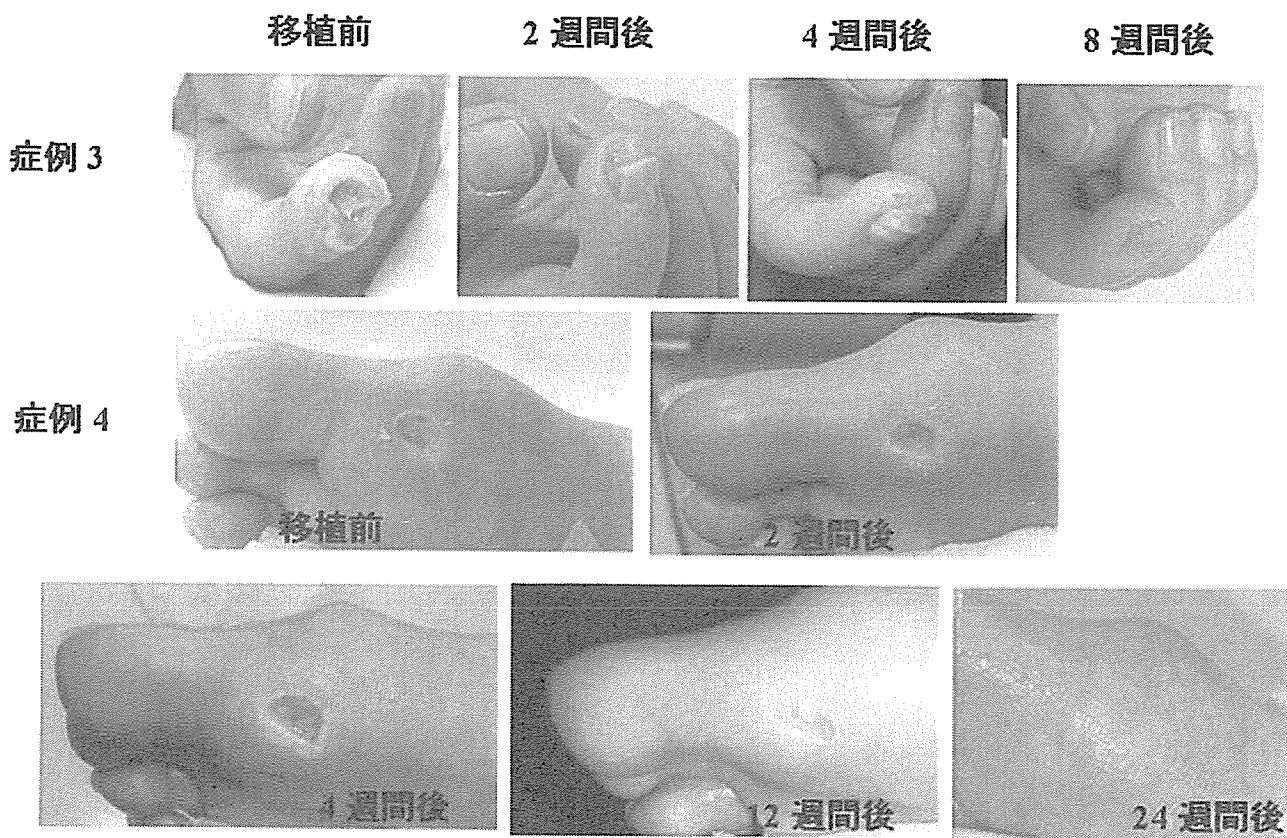


図3. 皮膚潰瘍の大きさとVASの経過

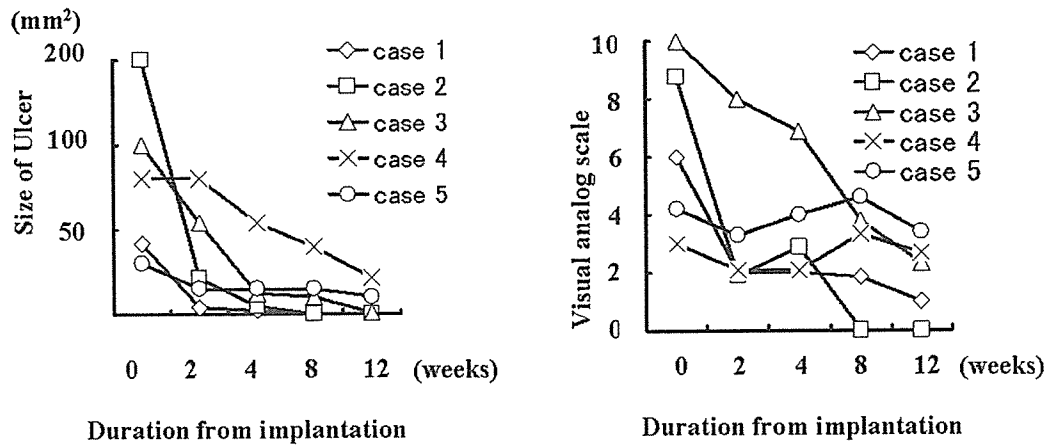


図4. SHAQおよびmRodnan TSSの経過

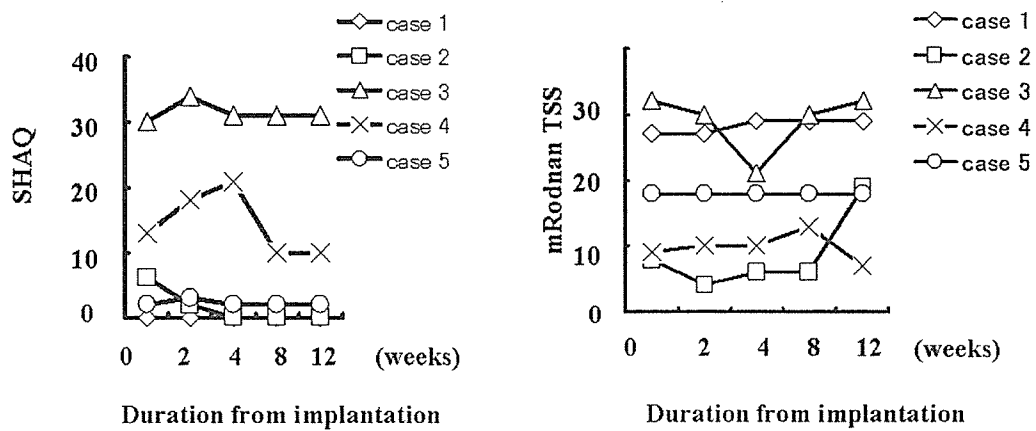


図5. パルスドップラーおよびサーモグラフィーによる検討 (症例2)

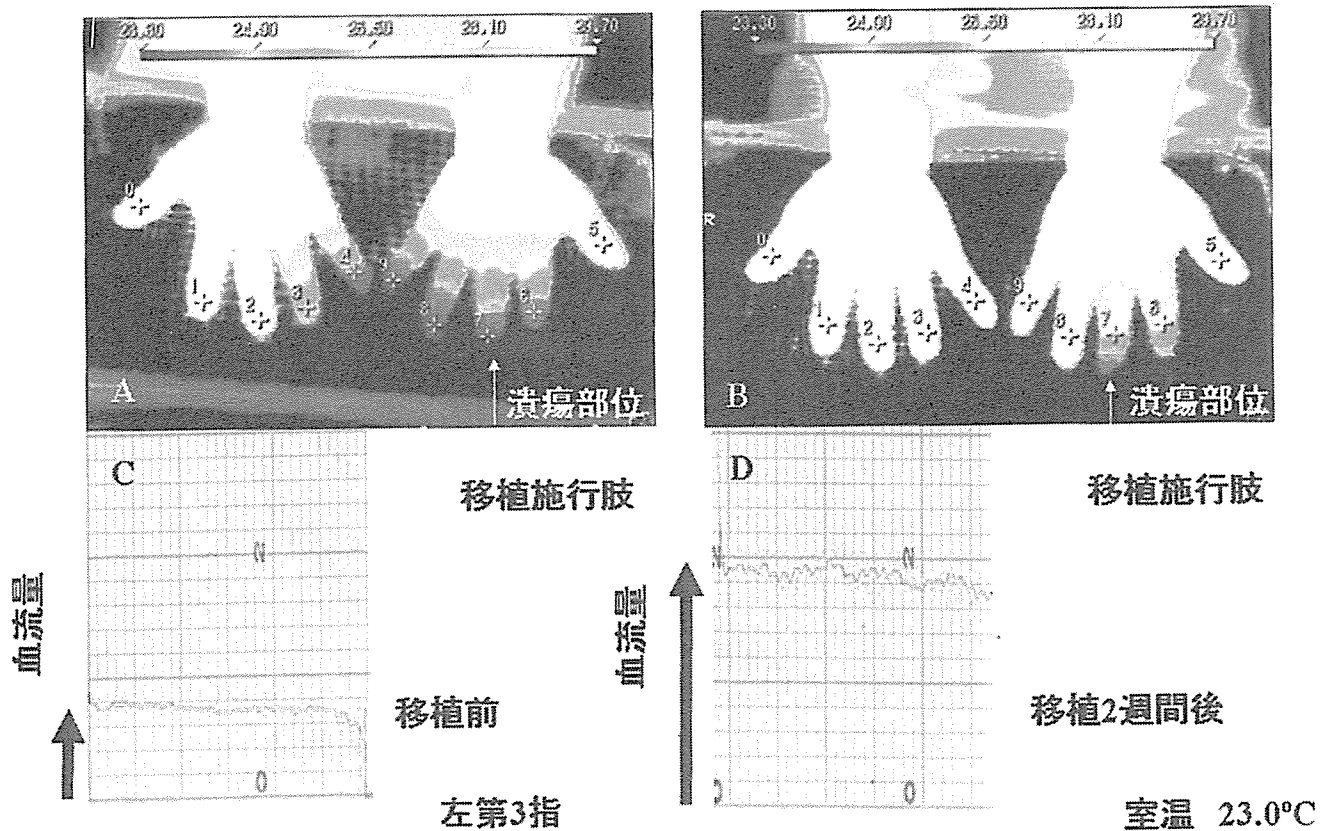


図6. 爪上皮毛細血管顕微鏡による検討 (症例1)

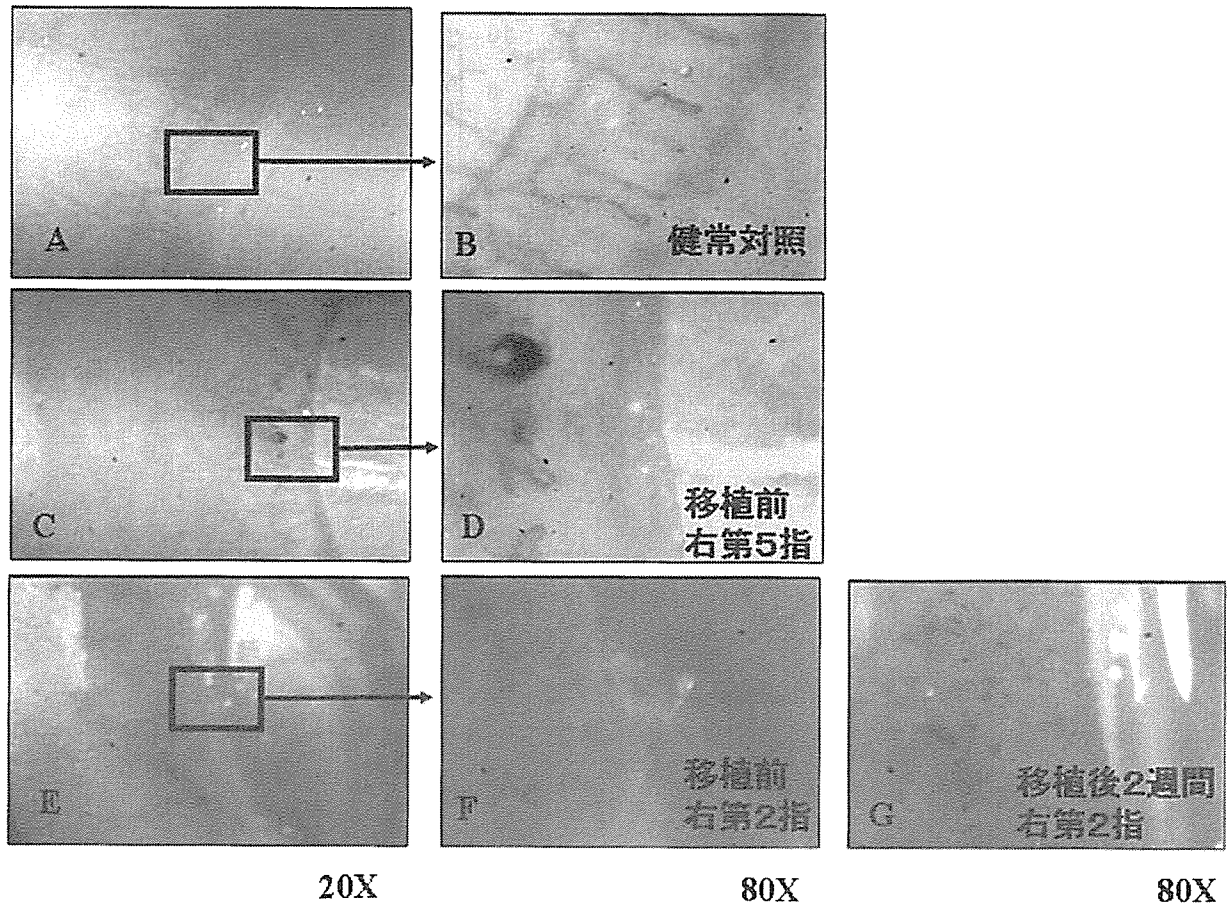


図7. 血管造影検査 (IA-DSA) による検討 (症例1)

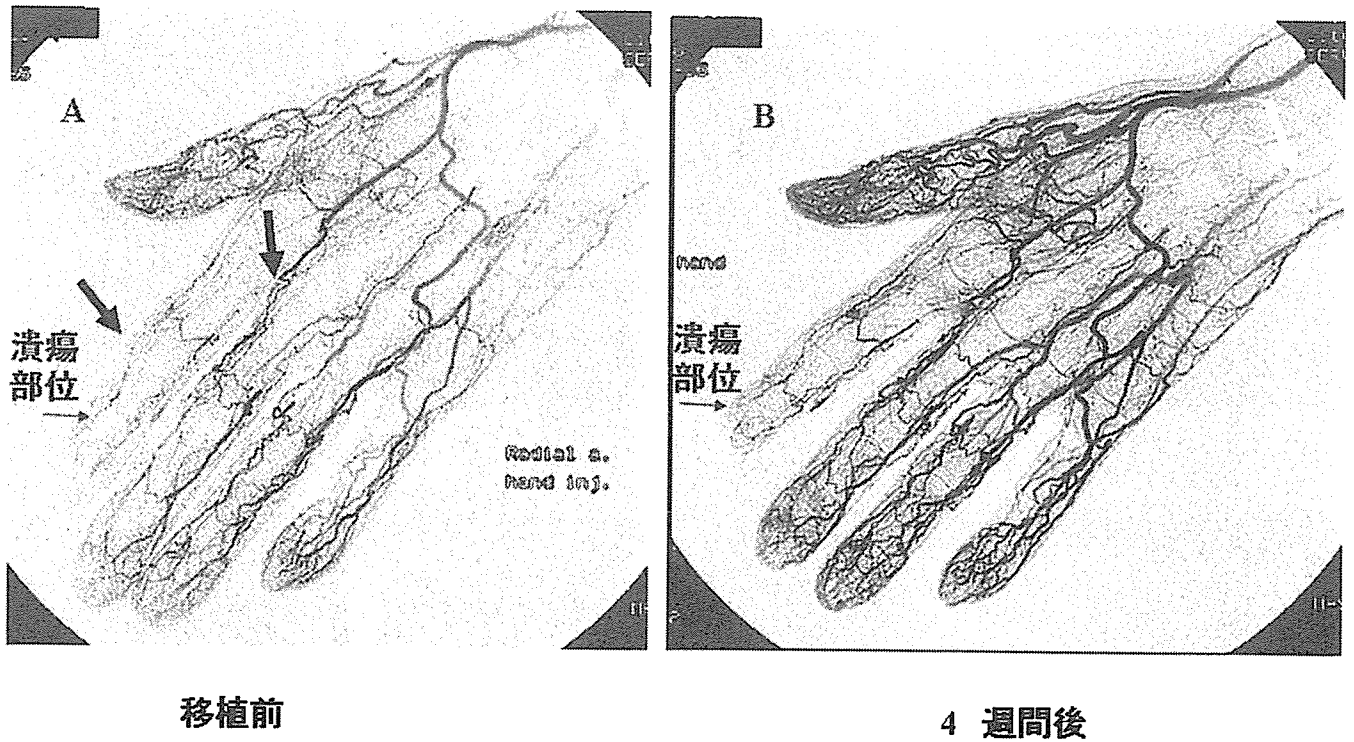


表1. 各症例の臨床的特徴

症例	1	2	3	4	5
年齢 (yr) / 性別	63 / F	50 / F	57 / F	72 / F	62 / F
罹病期間 (yr)	22	5	19	22	5
自覚症状					
Raynaud現象	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
m-Rodnan TSS (0-51)	27	8	32	9	18
SHAQ (0-60)	0	6	30	13	2
臓器合併症					
cardio-pulmonary	(-)	(-)	(-)	(-)	IP
gastro-intestinal	GERD	(-)	GERD/PBC	(-)	GERD
自己抗体					
ANA	1280 dis sp	1280 dis sp	1280 dis sp	1280 dis sp	80 sp
anti-centromere	140.1	136.0	189.3	89.9	<7.0
anti-Scl 70	< 7.0	< 7.0	< 7.0	8.9	<7.0
血管新生までの治療法					
PSL	(-)	(-)	5mg / day	(-)	8mg / day
prostaglandin	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

表2. 採取した骨髓液中のCD34陽性細胞数および移植した細胞数

症例	1	2	3	4	5
採取骨髓液量 (ml)	490	390	405	390	420
骨髓単核球細胞数 ($10^4 / \mu\text{L}$)	1.96	1.39	1.64	1.88	2.03
CD34 ⁺ 細胞 / μL (%)	3790 (2.22)	2300 (0.44)	1970 (2.49)	2210 (4.10)	1620 (1.74)
移植された単核球生 細胞数(10^9 cells)	3.44	1.06	1.56	1.07	1.73
移植されたCD34 生細胞数(10^7 cells)	7.58	0.46	3.94	4.42	3.01

表3. 血管新生療法後の臨床経過

	症例 1	症例 2	症例 3	症例 4	症例 5
フォローアップ期間	2年6ヶ月	1年8ヶ月	1年5ヶ月	1年6ヶ月	6ヶ月
皮膚潰瘍の転帰	上皮化	上皮化	上皮化	上皮化	縮小
有害事象	眩暈 (術直後のみ)	なし	咽頭痛 (術直後のみ)	なし	なし
皮膚潰瘍の再発	なし	非移植肢に血流 障害→壊疽	右第3指に 潰瘍再発	なし(非移植肢 にチアノーゼ)	なし
レイノー現象の出現	あり	あり	あり	あり	なし
LipoPGE ₁ の使用	あり	あり	あり	あり	なし

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。レーザードップラーは、全身性強皮症に認められるレイノー現象の評価に有用であることが報告されている⁽¹⁷⁾。図5 CおよびDは、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である。縦軸は血流量を示すが、移植後に血流量は約2倍に増加した。また、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。

3-6. 毛細血管顕微鏡による爪上皮毛細血管の検討

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。図6 A (20倍) および B (80倍) は、健常対照の毛細血管を示す。爪上皮毛細血管は、径10 μ m程度の血管が近位から遠位に向かいヘアピン構造を形成後再び近位に帰るが、管内を血球が迅速に流れている様子が観察される。図6 (C-G) に、血管新生療法を施行した症例の爪上皮毛細血管の治療経過の一例を示す。潰瘍が認められない右第5指では、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著明な拡張が認められた (C: 20倍、D: 80倍)⁽¹³⁾。管内を流れる血球の速度は非常に緩慢であり、血流が途絶している箇所も散見された。さらに、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 (E: 20倍、F: 80倍)、移植2週間後には、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 (G)。

3-7. 経動脈的digital subtraction angiography (IA-DSA) による解析

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、経動脈的digital subtraction angiography (IA-DSA) を施行した。代表例として症例1の移植前および移植8週間後の結果を図7に示す。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 (図7 A黒矢印)。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 (図7 B白矢印)。

3-8. 移植後の臨床経過について

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。症例3の移植を施行した同側肢に新しい潰瘍を生じたが (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。症例2は、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が認められ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。

3-9. 有害事象について

表3に示すとおり、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。その他の有害事象は、術中術後ともに現在まで認めていない。

4. 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症例に対し自己骨髄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。

2002年に報告されたTACT studyは、主としてBuerger病や閉塞性動脈硬化症に併発した虚血肢が対象であり⁽¹⁴⁾、膠原病・リウマチ性疾患への応用は、背景に免疫学的異常を認めること、治療にステロイドや免疫抑制薬などが使用されることなどから、膠原病・リウマチ性疾患に対する血管新生療法の有用性については十分には検討されていない。

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⁽¹⁵⁾。今回の症例の中にもCD34陽性細胞率が低下している症例（症例2）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ため、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。

有効性に関しては、術前術後でサーモグラフィ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。血流障害に関する評価法としてTACT studyでは、経皮的酸素分圧（TCPO₂）が用いられているが、私どもは測定センサーの密着性（特に全身性強皮症では皮膚硬化などの問題もあり）、計測値の安定性などの問題から評価法として採用しなかった。上下肢の血圧比を測定するABIは有意な変化を認めなかったが、全身性強皮症ではBuerger病や閉塞性動脈硬化症よりも末梢の血流障害も存在するためと考えられた。今後、移植細胞の血管内皮への分化の割合、血管形成への影響の程度なども含めて、より客観性を持った低侵襲性の評価法の開発が望まれる。

表3に血管新生療法後の臨床経過を示したが、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（表3）。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はの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。症例3は、骨髄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。症例3の経験から、血管新生療法が一定の期間の後に複数回の移植も可能であることを示唆している。

自己骨髄幹細胞移植による血管新生療法の効果は、移植された血管内皮前駆細胞によるangiogenesisばかりではなく、血管内皮前駆細胞およびそれ以外の骨髄細胞から産生される血管新生促進因子（VEGF、bFGF、angiopoietin-1など）による作用も考えられている。今回のすべての症例において、比較的早期に疼痛の軽減を認めた理由の一つとしてこのような因子が関与している可能性を示唆する。現在、血管新生療法を施行した症例の血清および細胞を用いて、移植前後での血管新生因子の動態を解析している。今後さらに症例を蓄積し移植細胞および血管新生関連因子を解析することにより、血管新生のメカニズムについても解析を進めたい。

5. 結語

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。

6. 文献

1. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, vanderZeeR, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964-967, 1997
2. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C,

- Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85: 221-228, 1999
3. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 5: 434-438, 1999
 4. 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
 5. Noishiki Y, Tomizawa Y, Yamane Y, Matsumoto A. Autocrine angiogenic vascular prosthesis with bone marrow transplantation. *Nat Med* 2: 90-93, 1996
 6. Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 92: 362-367, 1998
 7. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, Masaki H, Mori Y, Iba O, Tateishi E, Kosaki A, Shintani S, Murohara T, Imaizumi T, Iwasaka T. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* 104: 1046-1052, 2001
 8. 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 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 randomised controlled trial. *Lancet* 360: 427-435, 2002
 9. Sapadin AN, Esser AC, Fleischmajer R. Immunopathogenesis of scleroderma--evolving concepts. *Mt Sinai J Med* 68: 233-242, 2001
 10. Herrick AL, Clark S. Quantifying digital vascular disease in patients with primary Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 57: 70-78, 1998
 11. Taylor MH, McFadden JA, Bolster MB, Silver RM. Ulnar artery involvement in systemic sclerosis (scleroderma). *J Rheumatol* 29: 102-106, 2002
 12. Charles C, Clements P, Furst DE. Systemic sclerosis: hypothesis-driven treatment strategies. *Lancet* 367: 1683-1691, 2006
 13. Distler O, Del Rosso A, Giacomelli R, Cipriani P, Conforti ML, Guiducci S, Gay RE, Michel BA, Bruhlmann P, Muller-Ladner U, Gay S, Matucci-Cerinic M. Angiogenic and angiostatic factors in systemic sclerosis: increased levels of vascular endothelial growth factor are a feature of the earliest disease stages and are associated with the absence of fingertip ulcers. *Arthritis Res* 4(6), 2002
 14. Choi JJ, Min DJ, Cho ML, Min SY, Kim SJ, Lee SS, Park KS, Seo YI, Kim WU, Park SH, Cho CS. Elevated vascular endothelial growth factor in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 30: 1529-1533, 2003
 15. Kuwana M, Okazaki Y, Yasuoka H, Kawakami Y, Ikeda Y. Defective vasculogenesis in systemic sclerosis. *Lancet* 364: 603-610, 2004
 16. Kuwana M. Potential benefit of statins for vascular disease in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 18: 594-600, 2006
 17. Ihata A, Shirai A, Okubo T, Ohno S, Hagiwara E, Ishigatsubo Y. Severity of seropositive isolated Raynaud's phenomenon is associated with serological profile. *J Rheumatol* 27: 1686-1692, 2000

「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 助教授

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IV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。^{99m}Tc-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) があつたが, 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. JMCC in press

- (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、赤石諭史、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回日本外科学系連合学会総会 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

骨髓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

末梢血行障害に対する自己骨髓幹細胞移植による血管再生治療

分担研究者 藤本 和輝
研究協力者 宮尾 雄治、村上 和憲、田中 朋子、福嶋 隆一郎
独立行政法人国立病院機構熊本医療センター
心臓血管センター内科

要旨

【目的】

内皮前駆細胞が発見され、末梢血行障害をきたす閉塞性動脈硬化症、バージャー病に対して、自己骨髓幹細胞移植を用いた、血管再生療法が臨床応用されるようになった。閉塞性動脈硬化症、バージャー病だけでなく、他に治療法が無い末梢血行障害を認める患者に対して自己骨髓幹細胞移植による血管再生療法を施行し、その有用性を検討する。

【対象】

他に治療法が無い末梢血行障害を認める患者 21例、40肢、男性17例、女性4例、平均年齢 62.6 ± 15.7 歳。動脈硬化性（閉塞性動脈硬化症）12例、20肢、男性11例、女性1例、平均年齢 71.9 ± 6.1 歳。非動脈硬化性（バージャー病 6例、膠原病 2例、外傷性 1例）、9例、20肢、男性6例、女性3例、平均年齢 51.9 ± 16.3 歳。

【方法】

全身麻酔下に腸骨から骨髓液を採取し、幹細胞を濃縮分離し、患肢に数十箇所筋注する。

【結果】

- 1：全例翌日から、自覚症状の改善を認めた。
- 2：レイザードプラー血流計で、急性期の血流改善を認めた。
- 3：閉塞性動脈硬化症の3症例で、一旦改善したが、その後、悪化し切断となった。
- 4：その他の症例は、平均約19ヶ月経過観察をしているが、症状の悪化を認めず、維持できている。

5：膠原病、外傷性による血行障害に対しても有効であった。

【結語】

- 1：閉塞性動脈硬化症、バージャー病だけでなく、膠原病、外傷性による末梢血行障害に対しても有効であることが示唆された。
- 2：自己骨髓幹細胞移植による血管新生療法は、他に治療法が無い末梢血行障害に対して、非常に有効であった。

緒言

内皮前駆細胞が発見され、末梢血行障害をきたす閉塞性動脈硬化症、バージャー病に対して、自己骨髓幹細胞移植を用いた、血管再生療法が臨床応用されるようになり、その有用性が報告されている。今回、閉塞性動脈硬化症、バージャー病だけでなく、他に治療法が無い末梢血行障害（膠原病、外傷性）による重症虚血肢を認める患者に対して血管新生療法を施行し、その有用性を検討した。

方法

全身麻酔下に腸骨から骨髓液を採取し、幹細胞を濃縮分離し、患肢に数十箇所筋注する。また、必要に応じて壊疽部分の切断を行う。

対象

他に治療法が無い末梢血行障害を認める患者 21例、40肢、男性17例、女性4例、平均年齢 62.6 ± 15.7 歳。

表1. 動脈硬化性症例

症例	性別	年齢	治療部位	合併症
1	男性	60	左下肢	OMI
2	男性	78	両下肢	OMI、P-PCI、P-CABG、HT、DM、HL
3	男性	78	両下肢	AP、P-PCI、P-CABG、HT
4	女性	67	両下肢	AP、P-PCI、HT、DM、HD
5	男性	76	両下肢	AP、P-CABG、HT、DM、HL
6	男性	67	両手掌	AP、P-PCI、HT、DM、HD
7	男性	78	左下肢	HT
8	男性	67	両下肢	AP、P-PCI、HT、DM、HD
9	男性	77	右下肢	HT、DM
10	男性	67	両下肢	OMI、P-PCI、HT、DM
11	男性	73	左下肢	DM、HD
12	男性	75	両下肢	OMI、P-PCI、HT、DM

OM：陳旧性心筋梗塞、AP：狭心症、HT：高血圧症、DM：糖尿病、HL：高脂血症
P-PCI：経膚の冠動脈形成術後、P-CABG：冠動脈バイパス術後、HD：血液透析

動脈硬化性症例（閉塞性動脈硬化症）12例、20肢、男性11例、女性1例、平均年齢71.9±6.1歳。（表1）

表2. 非動脈性症例

症例	性別	年齢	原疾患	治療部位
1	男性	60	バージャー病	右上肢
2	男性	21	結節性多発性動脈炎	四肢
3	男性	46	バージャー病	左下肢
4	男性	46	外傷性血行障害	左上肢
5	男性	57	バージャー病	両上肢、左下肢
6	女性	41	バージャー病	四肢
7	女性	68	強皮症	左上肢、両下肢
8	男性	74	バージャー病	両下肢
9	女性	39	バージャー病	右下肢

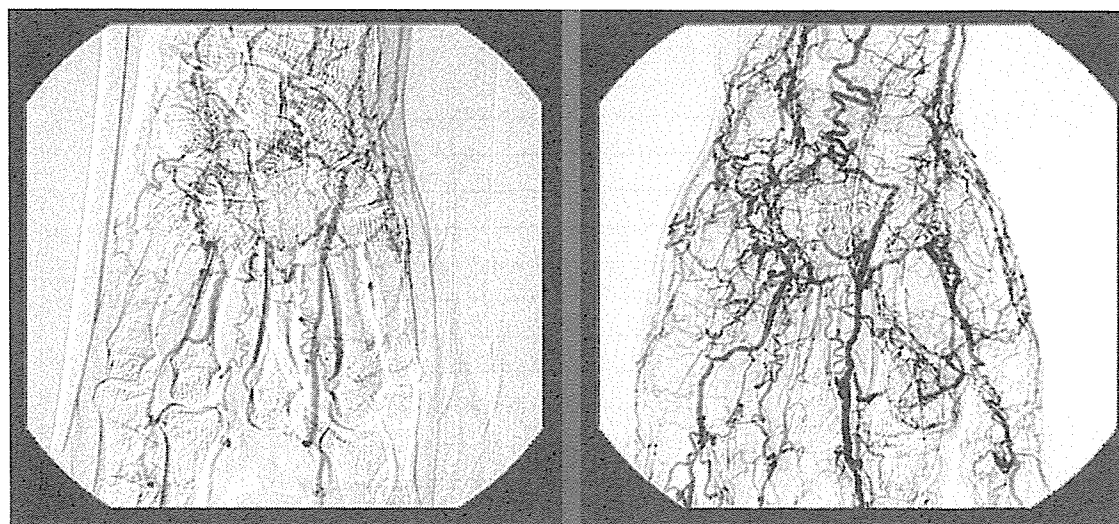
非動脈硬化性症例（バージャー病 6例、膠原病 2例、外傷性血行障害 1例）、9例、20肢、男性6例、女性3例、平均年齢51.9±16.3歳。（表2）

表3. 結果（動脈硬化性症例）

症例	性別	年齢	治療部位	治療効果
1	男性	60	左下肢	自覚症状消失、日常歩行可能
2	男性	78	両下肢	いったん改善したが、両下肢切断
3	男性	78	両下肢	自覚症状消失、日常歩行可能
4	女性	67	両下肢	自覚症状消失、日常歩行可能
5	男性	76	両下肢	自覚症状消失、日常歩行可能
6	男性	67	両手掌	自覚症状改善、虚血性潰瘍治癒
7	男性	78	左下肢	自覚症状消失、日常歩行可能
8	男性	67	両下肢	自覚症状消失、日常歩行可能
9	男性	77	右下肢	いったん改善したが、右下肢切断
10	男性	67	両下肢	自覚症状消失、日常歩行可能
11	男性	73	左下肢	いったん改善したが、左下肢切断
12	男性	75	両下肢	自覚症状消失、日常歩行可能

表4. 結果（非動脈硬化性症例）

症例	性別	年齢	原疾患	治療部位	治療効果
1	男性	60	バージャー病	右上肢	自覚症状消失
2	男性	21	結節性多発性動脈炎	四肢	傷治癒、自覚症状消失
3	男性	46	バージャー病	左下肢	潰瘍治癒、自覚症状消失
4	男性	46	外傷性血行障害	左上肢	自覚症状消失
5	男性	57	バージャー病	両上肢、左下肢	傷治癒、自覚症状消失
6	女性	41	バージャー病	四肢	自覚症状消失
7	女性	68	強皮症	左上肢、両下肢	傷治癒、自覚症状消失
8	男性	74	バージャー病	両下肢	自覚症状消失
9	女性	39	バージャー病	右下肢	自覚症状消失



治療前

治療後

図1 バージャー病（非動脈硬化性症例1）

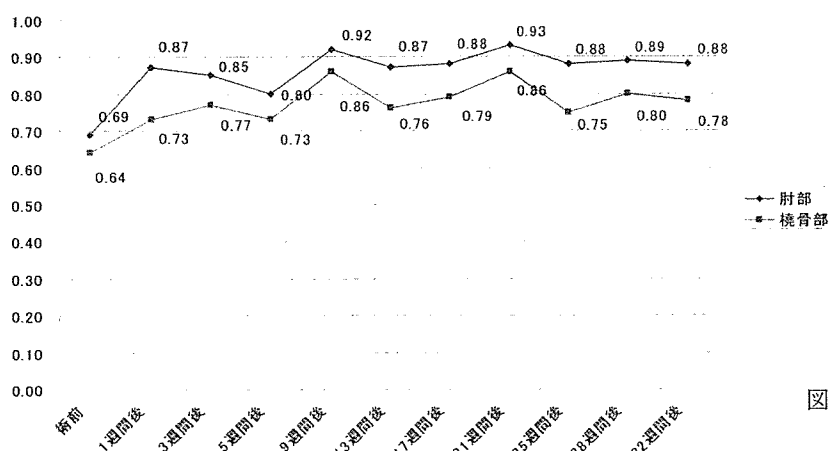


図 2

結果

1. 動脈硬化性症例（表3）

全例、翌日から自覚症状の改善を認めた。その後、12例中9例で有効であったが、残念ながら3例でその後悪化し、急性期に切断となった。

2. 非動脈硬化性症例（表4）

全例、翌日から自覚症状の改善を認めた。

壊疽を認めた3例は、壊疽部の切断を行ったが、壊疽部の切断のみで完全に傷治癒した。

症例1：62Y、男性

主訴：右上肢冷感

現病歴：バージャー病で治療中。特に右上肢に冷感を自覚するようになった。

左上肢の血圧が正常に測定できたので、重症度の指標としてABI相当の右肘部血圧/左上肢血圧、および、右橈骨部血圧/左上肢血圧を用いた。右肘部血圧/左上肢血圧=0.69右橈骨部血圧/左上肢血圧=0.64と低下していた。

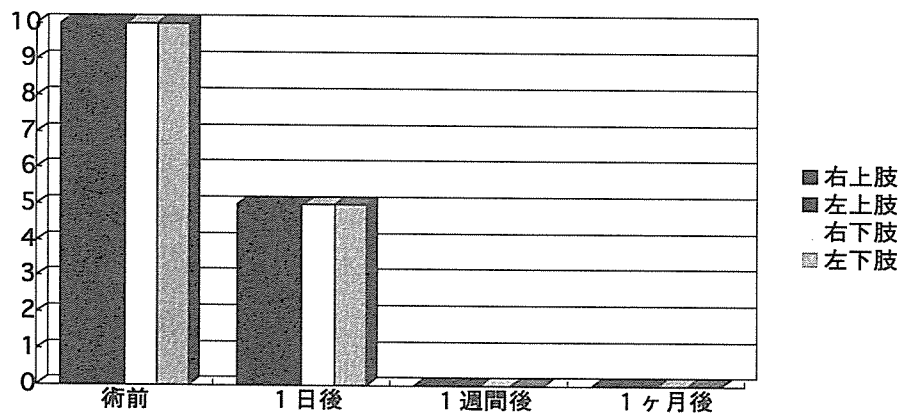


図3. 四肢の冷感

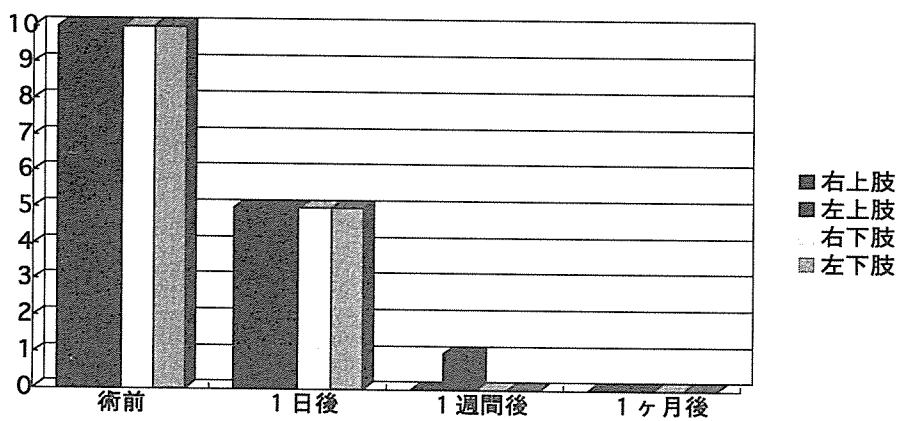


図4. 四肢の疼痛

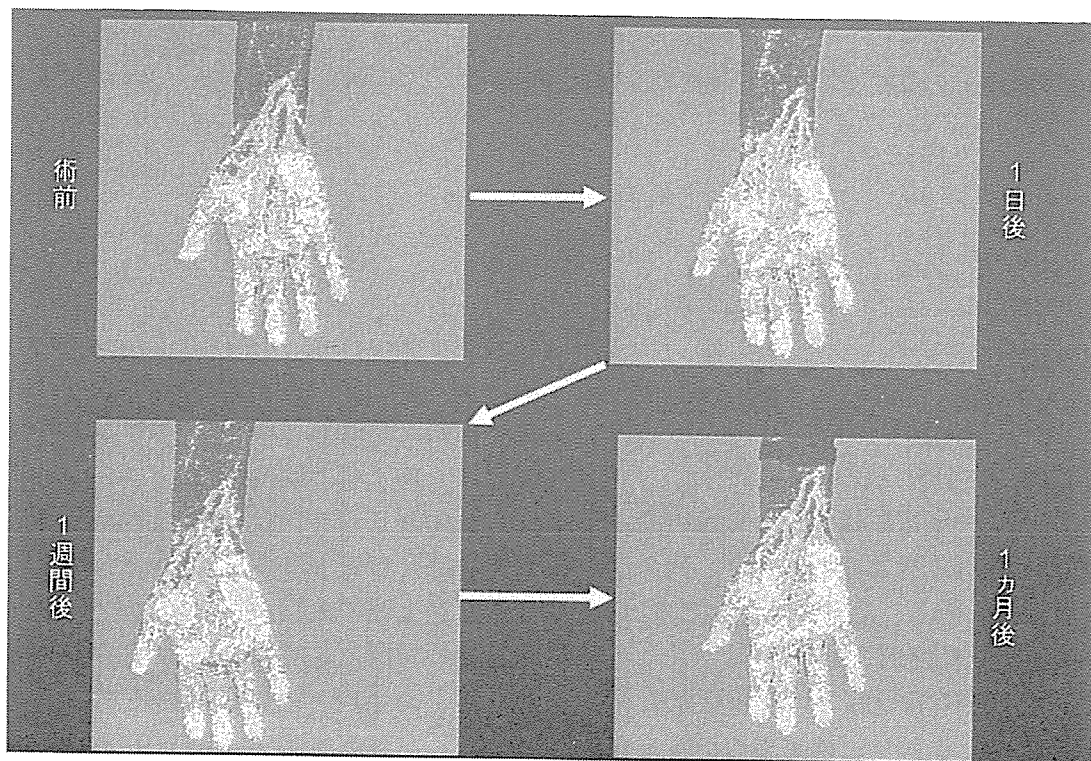


図5. レザードプラー血流計

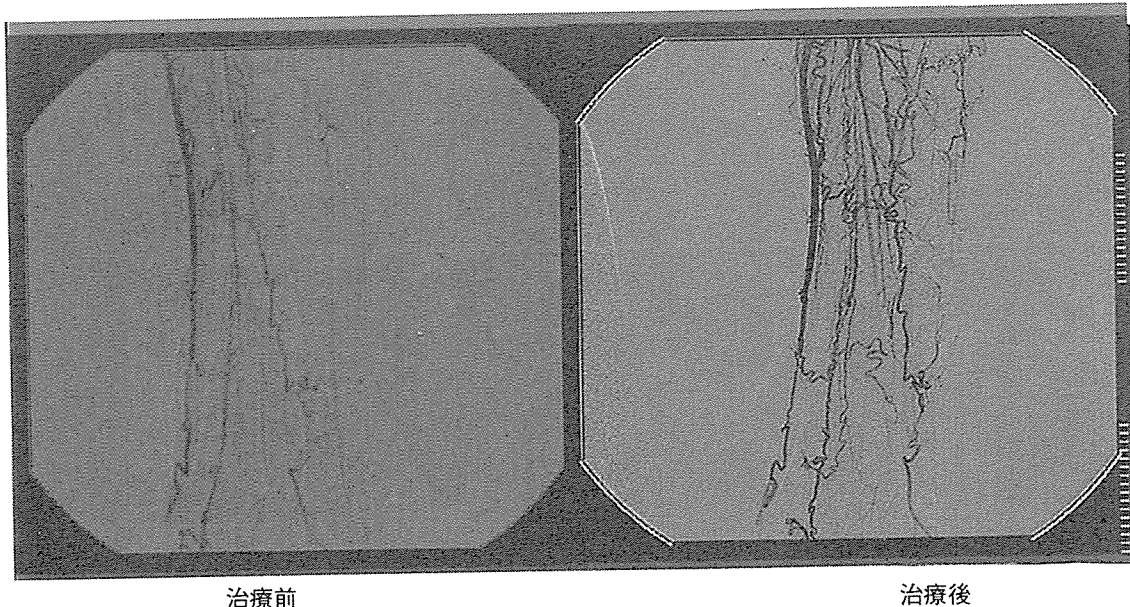


図6

経過：右上肢全体に血管再生療法を施行した。翌日から自覚症状が改善した。図1に術前後の血管造影を示すが、著名に側副血行路が増加していた。また、図2に上記ABI相当の値の変化を示すが、徐々に改善し、肘部で0.9、橈骨部で0.8まで改善した。また、17週以後、肘部の値を、赤で示しているが、肘部の動脈拍動を触知するようになった。3年4ヶ月経過したが、経過良好である。

症例2：41Y、女性

主訴：四肢冷感、疼痛

現病歴：バージャー病で治療中。四肢冷感、疼

痛が悪化したため、血管再生療法目的で紹介。

経過：四肢に血管再生療法を施行した。翌日から自覚症状が改善した。図3に冷感、図4に疼痛の改善の経過を示すが、翌日、約半分以下に改善し、1週間ではほぼ消失し、1ヶ月で完全に消失した。その後も、悪化を認めていない。図5にレイザードプラー血流計の結果を示すが、自覚症状の改善と一致して血流の改善を認めた。また、図6に術前後の血管造影を示すが、著名に側副血行路が増加していた。13ヶ月経過したが、経過良好である。

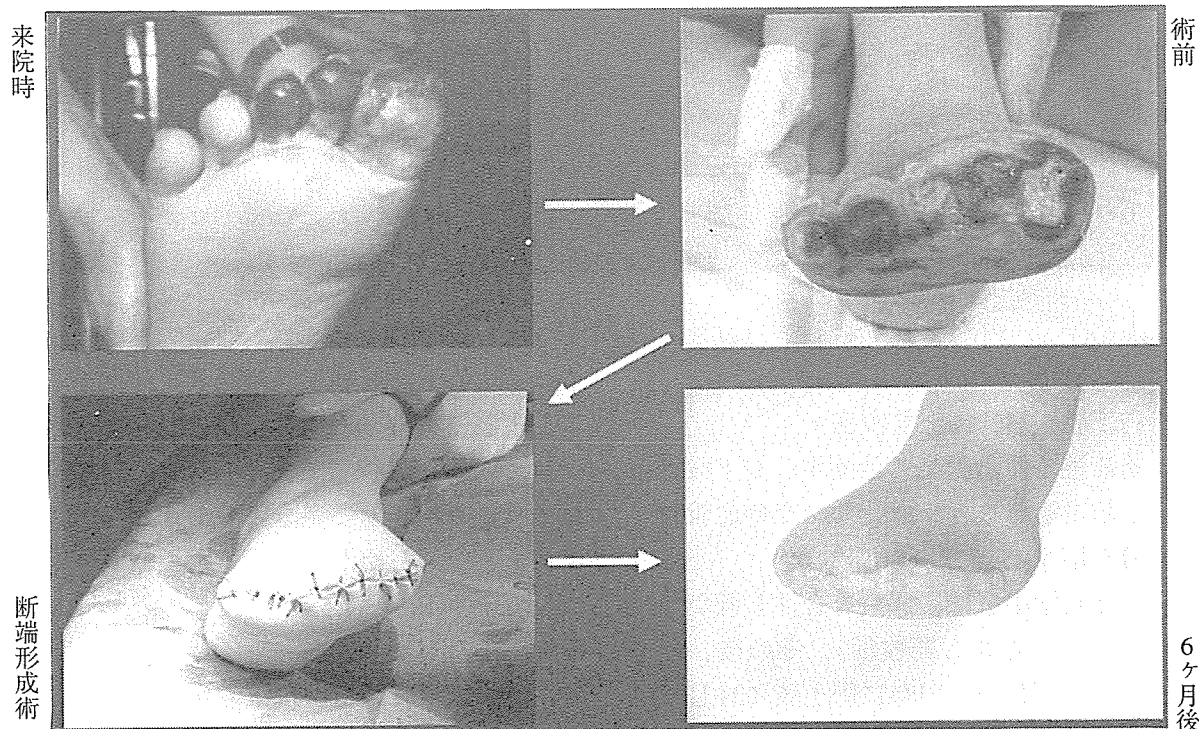
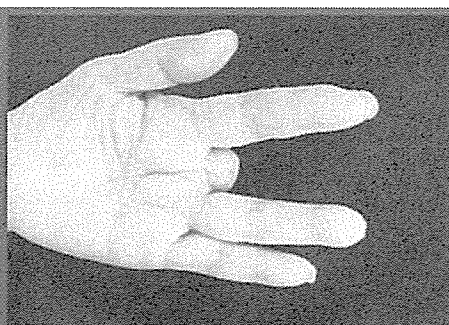
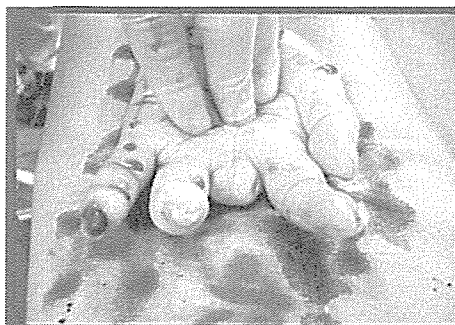


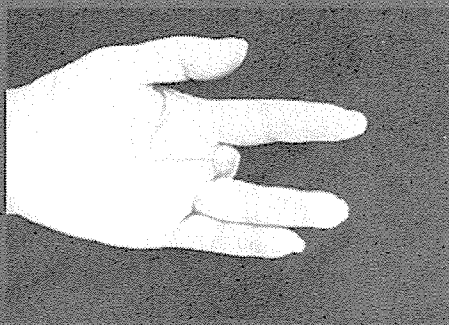
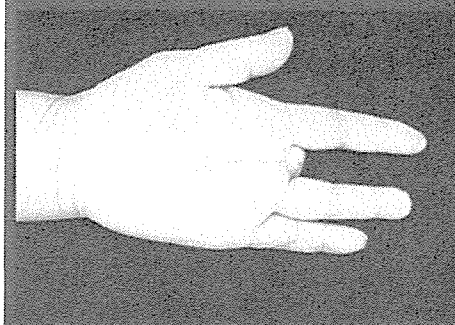
図7

治療前



1ヶ月後

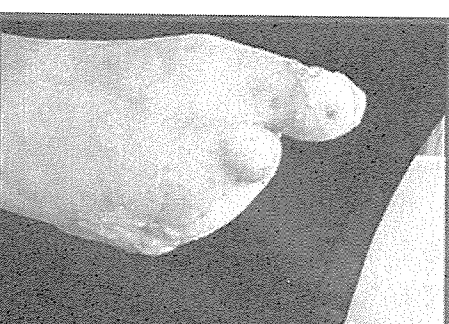
2ヶ月後



3ヶ月後、退院時

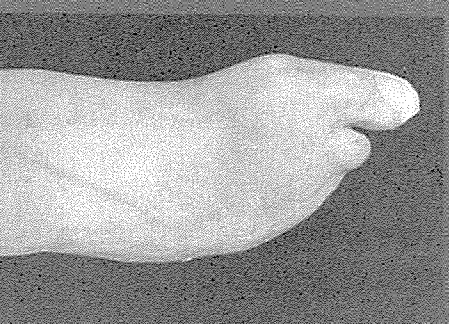
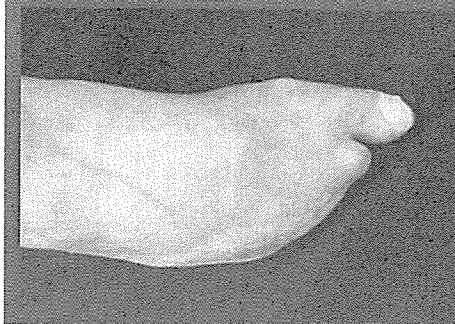
図8

治療前



1ヶ月後

2ヶ月後



3ヶ月後、退院時

図9

症例3：21Y、男性

主 訴：右下肢壊疽、両上肢潰瘍

現病歴：結節性多発動脈炎で治療中。右下肢趾壊疽、両上肢潰瘍となり、悪化したため血管再生療法目的で紹介。

経 過：右下肢趾壊疽は、感染を合併し低いため切断術を行い（ただし開放創）、その後、血管再生療法を施行した。同時に両上肢に対して

も施行した。施行後、下肢断端部の悪化を認めず、上肢潰瘍部は改善した。術後19日目に断端形成術を施行した。その後、創部の悪化を認めず、6ヵ月後に完全に治癒した（図7）。1年11ヶ月经過したが、経過良好である。

症例4：69Y、女性

主 訴：両下肢壊疽、左第5指壊疽

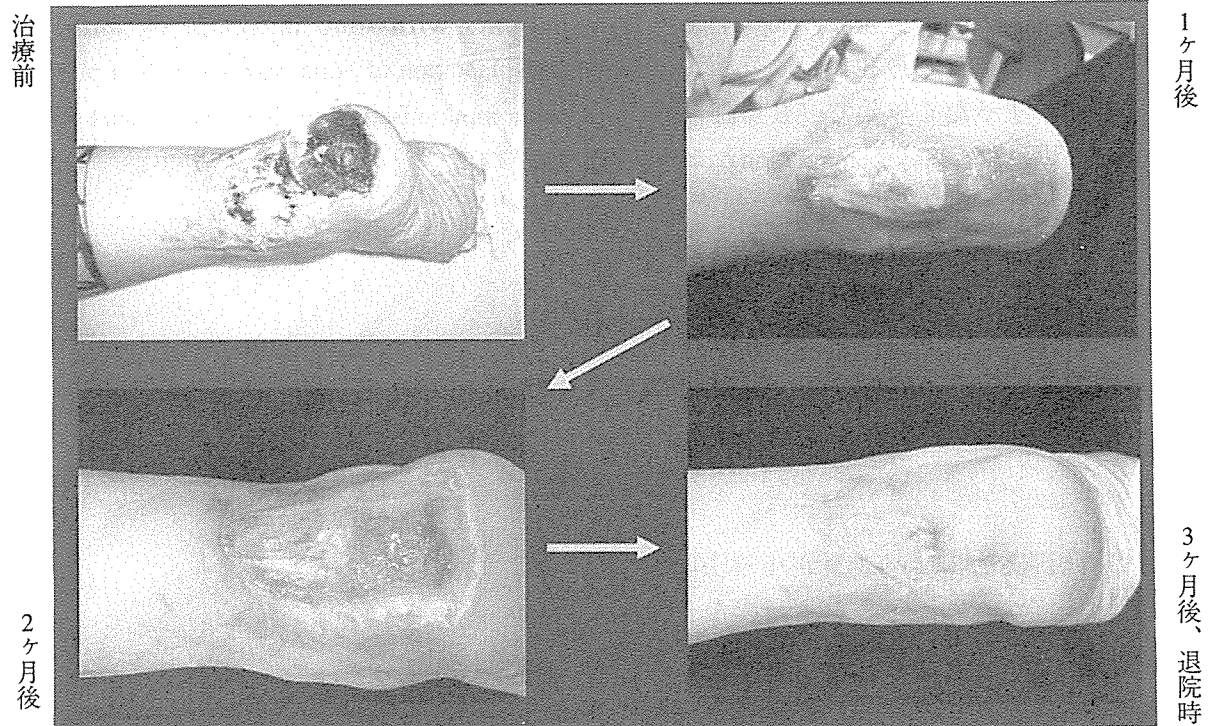


図10

現病歴：強皮症で治療中。両下肢のチアノーゼが悪化しだした。治療を行うが感染、壊疽の悪化を認め血管再生療法目的で紹介。

経過：両下肢、左上肢に血管再生療法を施行した。また、同時に、断端形成、デブリーとメントを施行した。左第5指壊疽は、1ヵ月後に完全に治癒した（図8）。右下肢は、1ヵ月後、ほぼ完全に治癒した（図9）。左下肢は、徐々に治癒し、2ヶ月半後、ほぼ治癒していたが植皮術を追加し、3ヵ月後に完全に治癒し（図10）、独歩退院となった。11ヶ月経過したが、経過良好である。

以上のような結果から

1. 全例翌日から、自覚症状の改善を認めた。
2. レイザードプラー血流計で、急性期の血流改善を認めた。
3. 閉塞性動脈硬化症の3症例で、一旦改善したが、その後、悪化し切断となった。
4. その他の症例は、平均約19.3ヶ月（6～51ヶ月）経過観察でしているが、急性期に改善した症例は、症状の悪化を認めず、維持できている。
6. 膠原病、外傷性による血行障害に対しても有効であった。

考察

動脈硬化性症例は、残念ながら12例中3例でいったん改善したが、下肢切断となった。3例中2例（症例9、11）は、浅大腿動脈起支部で完全閉塞で、バイパス術を施行しようとしたが、石灰化が非常に強く、バイパス術が施行できなかった症例であった。浅大腿動脈起支部で完全閉塞で、側副血行路が良好であった症例に施行し成功した症例を経験していたので、下腿だけに血管再生療法を施行した。いったん改善したが、下肢切断となった。このような症例に対しては、浅大腿動脈領域の血行再建術（困難であるが経皮的血管形成術）を行ってから下腿に血管再生療法を追加するか、下肢全体に血管再生療法を行うなどの工夫が必要である。

しかし、残りの1症例は、浅大腿動脈領域は問題なく、膝下動脈だけの病変であった。潰瘍を認め、翌日から潰瘍が改善したが、その後、悪化し下肢切断となった。このような症例に関しては、どのようにしてよいかわからない。

一方、非動脈硬化性症例は、壊疽部の切断を施行したが、全例非常に良い結果であった。また、バージャー病だけでなく、膠原病、外傷性血行障害に対しても、非常に有効であった。

膠原病に関しては、血管再生療法で原疾患が