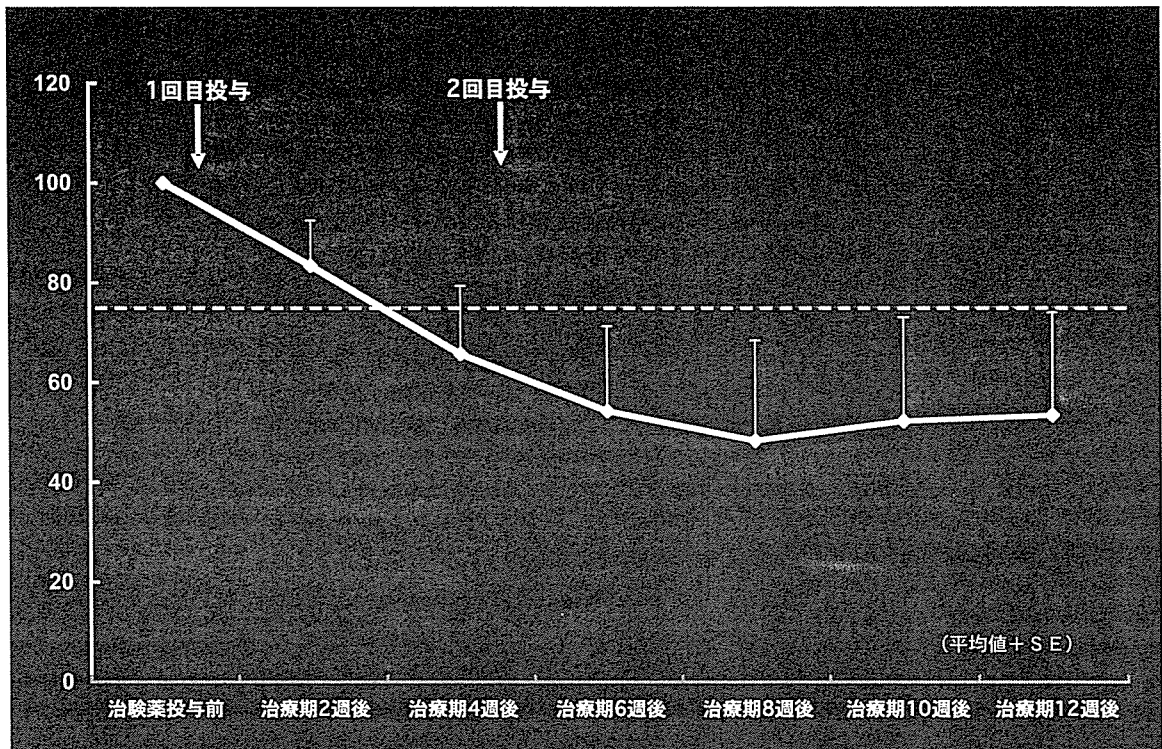
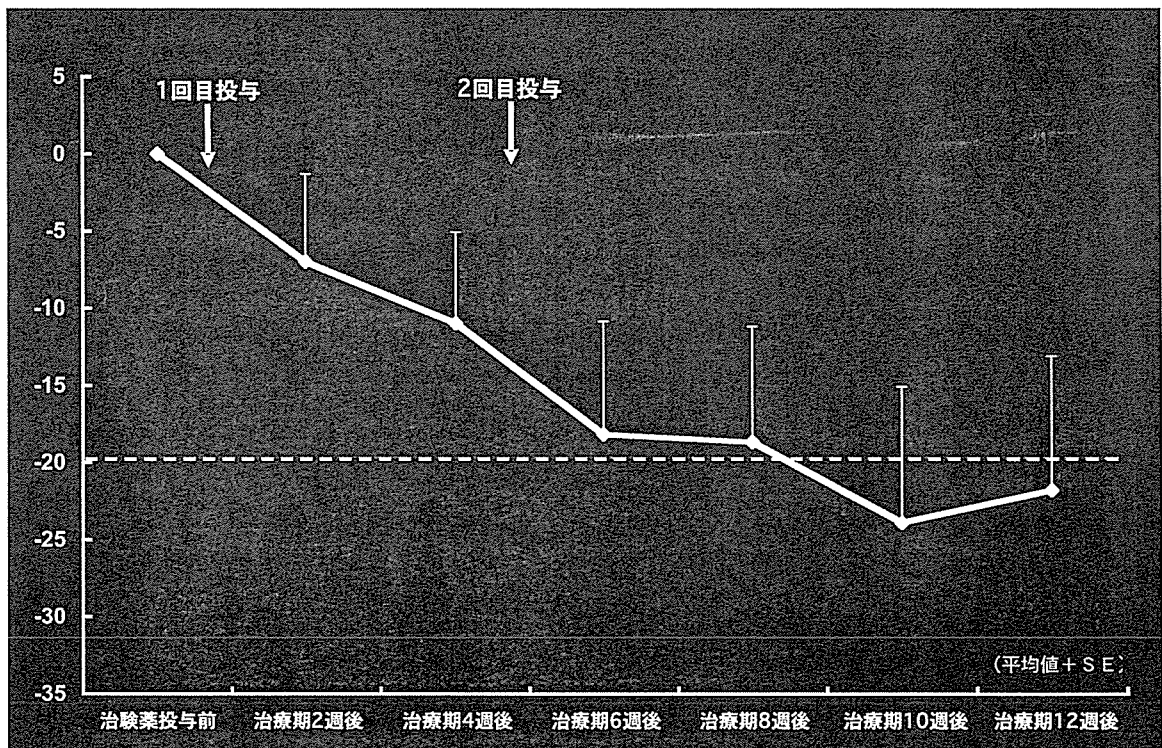


(図1) 潰瘍の大きさの推移



(図2) 安静時疼痛の推移



難治性血管炎に関する調査研究

分担研究者：浅原 孝之 東海大学医学部基盤診療学系 再生医療科学 教授

研究要旨

血管内皮前駆細胞移植療法による、血管性疾患に対する血管再生療法のトランスレーショナル研究を進めた。バージャー病及び閉塞性動脈硬化症による重症慢性下肢虚血を対象にした、自家血管内皮前駆細胞移植による血管再生治療に関する第I・II相臨床試験を計画した。下肢虚血に対する試験計画は、東海大学と先端医療センター・神戸市立中央市民病院の倫理委員会で実施の承認を得て、2003年11月から移植治療が開始されている。現時点で重篤な有害事象は発生せず、自他覚所見の改善が得られている。

分担研究者：浅原 孝之

所属機関名：東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学

職名：教授

A：研究目的

バージャー病及び閉塞性動脈硬化症による重症慢性下肢虚血に対する自家血管内皮前駆細胞（CD34陽性細胞）移植の臨床的有用性を明らかにする。

B：研究方法

上記の細胞移植治療に関する第I・II相試験を計画し、施行する。科学的に臨床試験を施行するため、独立したデータセンター、登録センターと共同で研究を進める。

* 倫理面への配慮

上記の臨床試験は、東海大学および先端医療センター再生医療審査委員会・神戸市立中央市民病院倫理委員会から実施の承認を得た後に、被験者から同意を得て開始される。

C：研究結果

重症慢性下肢虚血患者に対する上記臨床試験は、上記の手続きを経て開始された。顆粒球コロニー刺激因子製剤の投与により末梢血に動員された骨髓単核球細胞をアフレーションで採取し、磁気細胞分離により単核球から分離された血管内皮前駆細胞（CD34陽性細胞）を虚血下肢の筋肉内に移植している。現在までに21例の患者に対する移植が安全に行われ、自他覚所見の著明な改善が得られている。

D：考察

臨床試験の開始に先立って、豊富な基礎研究データの準備が重要であることは言うまでもないが、患者の倫理面に配慮し、移植治療を安全かつ有効に施行するためには、綿密に臨床試験を計画し、詳細な臨床試験プロトコルを作成することが重要である。今回、GCP規準臨床試験に準拠したプロトコルを作成することにより、臨床試験を安全にかつ科学的で、再現性の期待できる形で開始することができた。

E：結論

重症慢性下肢虚血患者に対する自家血管内皮前駆細胞（CD34陽性細胞）移植に関する第I・II相臨床試験を進展させた。

F:研究発表 1. 論文発表

1. Iwasaki H, Kawamoto A, Ishikawa M, Oyamada A, Nakamori S, Nishimura H, Sadamoto K, Horii M, Matsumoto T, Murasawa S, Shibata T, Suehiro S, Asahara T. Dose-Dependent Contribution of CD34-positive Cell Transplantation to Concurrent Vasculogenesis and Cardiomyogenesis for Functional Regenerative Recovery Post Myocardial Infarction. *Circulation*. 2006; 113:1311-1325
2. Iwakura A, Shastry S, Luedemann C, Hamada H, Kawamoto A, Kishore R, Zhu Y, Qin G, Silver M, Thorne T, Eaton L, Masuda H, Asahara T, Losordo DW. Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9. *Circulation*. 2006 Mar 28;113(12):1605-14.
3. Matsumoto T, Matsumoto T, Kawamoto A, Kuroda R, Ishikawa M, Mifune Y, Iwasaki H, Miwa M, Horii M, Hayashi S, Oyamada A, Nishimura H, Murasawa S, Doita M, Kurosaka M, Asahara T. Therapeutic Potential of Vasculogenesis and Osteogenesis Promoted by Peripheral Blood CD34-Positive Cells for Functional Bone Healing. *Am J Pathol*. 2006; 169(4):1440-1457.
4. Kawamoto A, Iwasaki H, Kusano K, Murayama T, Oyamada A, Silver M, Hulbert C, Gavin M, Hanley A, Ma H, Kearney M, Zak V, Asahara T, Losordo DW. CD34-positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization after myocardial infarction compared with total mononuclear cells. *Circulation*. 2006 Nov 14;114(20):2163-9.

2. 学会発表

Kawamoto A, Safety and Efficacy Is Sustained Up To One Year after Transplantation of Autologous CD34+ Cells in No-Option Patients with Chronic Critical Limb Ischemia. *Ame Heart Association Scientific Meeting* 2006.

G：知的財産の出願・登録状況

特記事項なし。

1. 特許取得
 2. 実用新案登録
 3. その他
- 特記すべき事なし

バージャー病と歯周病感染との因果関係に関する研究

分担研究者 岩井武尚 東京医科歯科大学血管・応用外科学分野教授

研究要旨

バージャー病患者の血管材料から歯周病菌が検出されたことをうけて種々の研究をスタートさせた。バージャー病患者の口腔内検査から歯周病の程度がコントロールに較べて有意に悪いこと、重症であることが判明した。さらに歯周病菌抗体も有意に_値であることも明らかになった。その他 3-4 のプロジェクトからバージャー病の感染説を裏付ける発表があった。

仮説が徐々に究明されつつある。

A. 研究目的

バージャー病について歯周病など慢性弱毒菌感染という視点から検討する。

B. 研究方法

バージャー病患者の口腔内検査、口腔内（プラーク）細菌の同定、抗体価の測定などを行った。歯周病菌と血小板との反応、歯周病菌と単核球との反応、歯周病菌と老化内皮細胞との反応などを in vitro にて行った。

（倫理面への配慮）

コントロールとして採血、口腔内検査を受けられた方には、本学倫理委員会の承認のもとに行う旨承諾して頂いた。

C. 研究結果

臨床的な成果として種々の診断、治療に関する発表、著書発行があった。また、基礎的研究の結果としてバージャー病と歯周病、喫煙との関係がさらに解明された。歯周病菌がどのようにして病変部に運ばれるのかについて血小板がその主役であろうことが判明した。バージャー病患者の歯周病罹患が顕著で高度であることが改めて証明され血清学的にも証明できた。

D. 考察

遺伝学的要素も研究しているが、歯周病とバージャー病とはともに易感染性に共通点があることが HLA からの検討で証明された。若年者の喫煙、血管の攣縮、血小板塊の塞栓、遺伝学的要素などが絡みあってバージャー病が発症するであろう

E. 結論

バージャー病は慢性弱毒菌感染による初期変化から引き起こされる血栓による閉塞性疾患である可能性が高い。

F. 研究発表

1. 論文発表

Chen Y, Iwai T, Umeda M, Nagasawa T, Huang Y, Takeuchi Y, Ishikawa I. Elevated IgG titers to periodontal pathogens related to Buerger disease. *Int J Cardio*. 2007; 117: 257-290.

Li X, Hirokawa M, Inoue Y, Sugano N, Qian S, Iwai T. Effects of acupressure on lower limb blood flow for the treatment of peripheral arterial occlusive diseases. *Surg Today*. 2007; 37: 103-108

Tsuchida H, Shigematsu H, Ishimaru I, Iwai T, Akaba N, Umezu S. Effect of low-density lipoprotein apheresis on patients with peripheral arterial disease. *Peripheral arterial disease LDL apheresis multicenter study (P-LAS)*. *Int Angio*. 2006; 25: 287-292.

工藤敏文, 岩井武尚. 下肢のしびれ バージャー病. *総合臨床*. 2006; 55: 2253-2255.

阿岸鉄三, 岩井武尚, 石丸 新, 天野 泉, 東 仲宣, 非高脂血症下肢閉塞性動脈硬化症に対するアフエレシス治療研究会. 非高脂血症下肢閉塞性動脈硬化症に対するアフエレシス治療の他施設臨床評価. *日本アフエレシス学会雑誌* 2006; 25: 42-51.

遊佐祐子, 岩井武尚. 間歇性跛行. *腎と透*

析 2004; 2004 増刊号: 60-63.

2. 学会発表

岩井武尚. 会長要望演題 1 Burger 病トピックス「バージャー病を追いつめる」. 第 34 回日本血管外科学会総会. 東京, 2006.5.11-12.

Chen Z, Inoue Y, Iwai T, Kurihara N, Jibiki M, Li X, Kubota T, Sugano N, Huang Y, Umeda M, Ishikawa I. Arterial thrombosis after intravenous infusion of Periodontal Bacteria in a rat model (2nd report). The 34th Annual meeting of Japanese society for vascular surgery.-The 3rd International session-. Tokyo, 2006.5.11.

Chen Y, Umeda M, Huang Y, Takeuchi Y, Kurihara N, Inoue Y, Iwai T. Elevated serum IgG antibody levels to Periodontal pathogens in patients with Burger disease. The 34th Annual meeting of Japanese society for vascular surgery.-The 3rd International session-. Tokyo, 2006.5.11.

Li X, Iwai T, Nakamura H, Inoue Y, Huang Y, Chen Y, Umeda M, Ishikawa I. Interaction of Porphyromonas gingivalis with human platelets and neutrophils: ultrastructural observations. The 52nd Annual congress of the Japan section. Tokyo, 2006.6.3.

Li X, Iwai T, Nakamura H, Inoue Y, Huang Y, Chen Y, Umeda M, Ishikawa I. The role of platelets in Buerger's disease. 第 31 回日本

外科系連合学会. 金沢, 2006.6.22-23.

Iwai T, Inoue Y, Kurihara N, Li X, Chen Z, Umeda M, Chen Y, Huang Y, Ishikawa I, Nakamura H, Kimura A. Comprehensive investigations into the etiology of Buerger disease. XXII World congress of the International union of angiology. Lisbon, 2006.6.24-28.

Li X, Iwai T, Nakamura H, Inoue Y, Huang Y, Chen Y, Umeda M, Ishikawa I. The Role of platelet-bacterial interaction in Buerger's disease. 7th International congress of the Asian society for vascular surgery. Kuala Lumpur, 2006.7.16-19.

Li X, Asahina M, Inoue Y, Iwai T, Nakamura H. Ultrastructural study of the arteries in Buerger's disease. The 8th National congress of vascular surgery of China. Shenyang, China. 2006.9.1-3.

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

予定無し

2. 実用新案登録

予定無し

3. その他

予定無し

血管新生における細胞内シグナル伝達機構の解析

佐々木 司、小櫃由樹生

東京医科大学外科学第二講座

分担研究者 重松 宏 東京医科大学外科学第二講座主任教授

研究要旨

細胞内情報伝達系の一因子である Protein kinase C (PKC)は血管内皮細胞を活性化するとされているが詳細は明らかではない。今回、PKC アイソフォームである PKC α 、PKC δ 、PKC ϵ に注目し、アデノウイルス遺伝子導入法により各 PKC が血管内皮細胞に及ぼす影響を調べた。PKC δ が血管新生に対して抑制的に働くことが示唆された。

A. 研究目的

細胞内情報伝達系の主要な因子の一つである Protein kinase C (PKC) の活性化は血管新生において血管内皮細胞の増殖、遊走、接着、管腔形成を促進するとされているが、PKC には多くのアイソフォームが存在し、それらの血管新生における役割の詳細については、明らかにされていない。今回、血管新生における PKC α 、PKC δ 、PKC ϵ の機能を解析した。

B. 研究方法

- 1) p53 $^{-/-}$ マウスからの血管内皮細胞株の樹立。
- 2) アデノウイルスで遺伝子導入し、PKC α 、 δ 、 ϵ を内皮細胞内に発現させる。
- 3) Western blotting 法で PKC α 、 σ 、 ϵ の発現を確認する。
- 4) MTT 法で PKC 発現後の生細胞数を測定する。
- 5) Tube formation assay で 12-O-tetradecanoylphorbol 13 acetate (TPA) により刺激した内皮細胞の tube formation を

観測する。

- 6) RT-PCR 法により内皮細胞の分子マーカーである Flk-1、MMP2、MMP9、Tie2 の発現を確認する。

(倫理面への配慮)

特記すべきこと無し。

C. 研究結果

樹立した血管内皮細胞に Ad-PKC \langle , Ad-PKC TM , Ad-PKC \rangle をそれぞれ感染させ、24 時間後に蛋白を回収し Western blotting 法により PKC の発現を検討した結果、感染細胞それぞれに導入蛋白の発現が確認された。

1. 血管内皮細胞における増殖能の変化

Ad-PKC \langle , Ad-PKC TM , Ad-PKC \rangle および Ad- $\text{\textcircled{g}}$ al (control) を感染させた内皮細胞における細胞増殖能を検討した結果、いずれも Ad- $\text{\textcircled{g}}$ al と比較して生細胞数に差が認められなかった。しかしながら、導入蛋白の活性化がない可能性も考えられ、TPA 刺激によりそれらの活性化を誘導した後に細胞増殖能を検討した。そ

の結果、Ad-PKC(および Ad-PKC™を感染した内皮細胞では Ad-@gal 感染内皮細胞と比較して 1nM, 3nM および 10nM の TPA 刺激でいずれも生細胞数に減少傾向が認められた。しかしながら、Ad-PKCΣ感染では生細胞数に差は認められなかった。以後の実験では本検討で最も差の認められた TPA 濃度 3nM を用い細胞を刺激した。

2. tube formation への影響

血管新生時には既に存在する血管から新たな血管が形成される。この血管の構築を *in vitro* で解析する方法が tube formation assay であり、Matrigel を添加した dish 上に血管内皮細胞を培養すると三次元構築が認められることを指標として解析を行う。内皮細胞を Matrigel 上に培養し、Ad-PKC(, Ad-PKC™, Ad-PKCΣあるいは Ad-@gal を感染後 3 nM TPA 存在下あるいは非存在下で tube formation を検討した。TPA 刺激により tube formation は促進され、それらを定量化した結果、統計学的な有意差は認められなかったが、Ad-@gal 感染と比較して、Ad-PKC(を感染させた際には tube formation が促進される傾向にあり、本傾向は独立して行われた複数回の実験により再現性が確認された。また、Ad-PKC(および Ad-PKC™を二重感染させた内皮細胞では細胞が索状構造を呈するものの個々の形態に顕著な変化はみられず、Ad-PKC(あるいは Ad-@gal の単独感染で認められる典型的な tube formation は認められなかった。

3. 遺伝子発現の検討

血管新生関連遺伝子の発現における PKC の役割を明らかにする目的で Ad-PKC(, Ad-PKC™, Ad-PKCΣおよび Ad-@gal をそれぞれ感染した内皮細胞における Tie-2, Flk-1 および MMP-2, 9 の遺伝子発現を RT-PCR により検討した。Ad-PKC™と Ad-PKCΣでは MMP-2 の発現に増加傾向が見られたが、Flk-1, MMP-9, Tie-2 の発現量に大きな変化は認められなかった。一方、Ad-PKCε感染内皮細胞に TPA 刺激を加えると Flk-1, MMP-9, Tie-2, MMP-2 の発現がいずれも増加し、特に MMP-9 については顕著であった。また Ad-PKC(および Ad-PKC™感染では MMP-9 の発現が増加した。

D. 考察

MMP-9 が PKC を活性化することにより、発現上昇していることから、PKC の活性化は血管新生初期段階を促進するものと考えられる。PKC α では tube formation の兆候があり、PKC ε では内皮細胞分子マーカーの発現が増加した。内皮細胞数の変化から、PKC α と PKC δ は内皮細胞の遊走増殖期には抑制的に働くことが示唆された。PKC δ はアポトーシス誘導時に活性化するとの報告があり、今回の実験でも血管新生に対して抑制的に働くことが示唆された。

E. 結論

PKC アイソフォームの中でも PKC δ は血管新生に抑制的に働くことが示唆された。PKC δ の活性を阻害することで血管新生を促進することができれば、血管新

生療法の新規治療法として応用が可能である。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当するものなし

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 高野 照夫 日本医科大学第一内科 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-tetorofosmine(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 μ l 及び 200 μ 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 \pm 16.3 (mm)に対して術後4週で 14.9 \pm 11.7 (mm)と著明に低下していた（ $p<0.0001$ ）．ABI は，術前 0.60 \pm 0.29 から術後4週で 0.73 \pm 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 \pm 53 秒から術後4週で 451 \pm 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) $0.3 \pm 0.4 \rightarrow 0.4 \pm 0.3$, (group N) $0.5 \pm 0.3 \rightarrow 0.5 \pm 0.1$, NS; Tc-TF (group A) $0.4 \pm 0.2 \rightarrow 0.7 \pm 0.2$, (group N) $0.8 \pm 0.2 \rightarrow 1.0 \pm 0.3$, NS。一方、TcPO₂はgroup Nで有意に増加 ($23.2 \pm 7.9 \rightarrow 40.3 \pm 10.8$ torr) したが、group Aでは有意に低下 ($12.7 \pm 15.3 \rightarrow 7.7 \pm 9.9$ 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-

tetorofosmine(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. 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

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

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

難治性血管炎の関する研究に関する研究

大型血管炎の臨床研究

末梢性血管疾患に伴う難治性潰瘍に対する局所分子治療法の開発

分担研究者 森下竜一 大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝子治療学講座客員教授

研究要旨

難治性潰瘍を伴う末梢性血管疾患治療において、大循環改善のみならず局所治療の総合的ケアを目指す。HGF 遺伝子の血管新生作用を局所治療にも応用し、HGF 遺伝子・PGIS 遺伝子の局所皮膚への導入により、創傷治癒促進・皮弁生着率の向上を確認した。また血管新生因子として新たにクローニングした抗菌ペプチド AG30 の潰瘍治療効果について検討した。

A. 研究目的

末梢性血管疾患治療において、大循環改善と局所治療の総合的ケアを目指し、遺伝子導入による血管新生療法と局所難治性潰瘍に対する分子治療法の開発を目的とする。既に実施した HGF 遺伝子を用いた遺伝子治療臨床研究（TREAT-HGF）では長期予後においても良好な結果が得られたが、同じ手法を局所にも応用し、HGF 遺伝子・PGIS 遺伝子の創傷治癒促進・皮弁生着率に及ぼす影響を検討する。また血管新生因子として新たにクローニングした抗菌ペプチド AG30 の潰瘍治療効果について検討する。潰瘍に関しても、局所血流改善を目的とし、合理的な治療遺伝子・治療物質を選択し、新しい治療法開発につなげる。

B. 研究方法

HGF 遺伝子・PGIS 遺伝子・抗菌ペプチド AG30 に注目し、各種潰瘍モデル・皮弁モデルにおける局所血流増加作用と創傷治癒・皮弁生着率促進効果の検討を行う。

C. 研究結果

ステロイド投与によるラット創傷遅延モデルにおいて、無針注射器シマジェットによる HGF 遺伝子と PGIS 遺伝子の共導入は、LDI で測定した局所血流の改善と上皮再生促進を誘導し、創傷治癒促進効果が確認できた。また、ラット皮弁モデルにおいて無針注射器シマジェットによる同遺伝子 naked plasmid の注射による遺

伝子導入を行ったところ、各遺伝子は基底膜周辺細胞に導入され発現が確認できた。遺伝子投与は皮弁処置の前投与が最も効果に優れ、3 日前の皮弁 distal half への導入により、生着率が有意に改善した。さらに糖尿病ラット(創傷遅延モデル)を用いた検討でも遺伝子導入により有意に生着率の改善が認められた。

また、血管新生因子として新たにクローニングした AG30 は 30 個のアミノ酸から成るペプチドであり、その構造から抗菌ペプチドであることが判明し、緑膿菌・黄色ぶどう球菌に対する抗菌作用を確認した。またマトリゲルを用いた研究で血管新生作用も明らかになり、Realtime PCR を用いた検討で VEGF, IGF, Angiopoietin2 などの産生増強がそのメカニズムである可能性も示唆できた。さらに ELSA にて HGF の発現上昇も確認できた。

D. 考察

抗菌ペプチド AG30 は抗菌作用、血管新生作用があることが判明し、preliminary な検討では皮膚線維芽細胞増殖作用があることも示唆できている。構造をアレンジすることにより抗菌作用・血管新生作用を調節することも可能であり、今後 in vivo の実験で十分な創傷治癒促進効果が得られる至的構造を検討していく。さらに皮膚浸透性の高めるため DDS としてナノ粒子を用いた検討も併用して行う。

E. 結論

HGF 遺伝子・PGIS 遺伝子・抗菌ペプチド AG30 の難治性潰瘍に対する有用性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kunugiza Y, Tomita N, Taniyama Y, Tomita T, Osako MK, Tamai K, Tanabe T, Kaneda Y, Yoshikawa H, Morishita R. Acceleration of wound healing by combined gene transfer of hepatocyte growth factor and prostacyclin synthase with Shima Jet. Gene Ther. 2006 Aug;13:1143-52.

Powell RJ, Dormandy J, Simons M, Morishita R, Annex BH. Therapeutic angiogenesis for critical limb ischemia: design of the hepatocyte growth factor therapeutic angiogenesis clinical trial. Vasc Med. 2004;9:193-8.

2. 学会発表

中川彩、青木下邦、森下竜一。「HGF・PGIS 遺伝子を用いた random pattern flap 生着率の向上」第 15 回日本形成外科学会基礎学術集会 2006 年 10 月 12 日

中川彩、青木下邦、森下竜一。「創傷治癒・難治性潰瘍に対する局所遺伝子導入法を用いた分子治療法の開発」第 15 回日本形成外科学会基礎学術集会 2006 年 10 月 12 日

G. 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

なし

【中・小型血管炎の臨床研究分科会】

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
 難治性血管炎に関する調査研究
 中・小型血管炎臨床研究分科会 平成 18 年度研究報告書

分科 会長	中林公正	杏林大学 第一内科教授
班 員	吉田雅治	東京医大八王子医療センター 腎臓内科教授
	小林茂人	順天堂大学 内科学助教授
	吉田俊治	藤田保健衛生大学 内科学教授
	古川福実	和歌山県立医大 皮膚科学教授
	槇野博史	岡山大学 内科学教授
	山田秀裕	聖マリアンナ医大 内科学助教授
	湯村和子	東京女子医科大学 腎臓内科助教授
	天野宏一	埼玉医大総合医療センター 内科学助教授

研究協力者	稲葉 裕	順天堂大学 衛生学教授
	臼井 崇	京都大学 内科学助手
	遠藤平仁	北里大学 内科学助教授
	大曾根康夫	市立川崎病院 内科部長
	兼岡秀俊	福岡大学 内科学助教授
	菊池弘敏	帝京大学 内科学助手
	熊谷俊一	神戸大学 内科学教授
	黒沢美智子	順天堂大学 衛生学助手
	小池隆夫	北海道大学 内科学教授
	鈴木康夫	東海大学 内科学教授
	住田孝之	筑波大学 内科学教授
	岳野光洋	横浜市大 内科学準教授
	八田和大	天理よろず病院 内科副部長
	原 まさ子	東京女子医大 内科学教授
	武曾恵理	北野病院 腎臓内科部長
	有村義宏	杏林大学 内科学助教授

研究要旨

1)MPO-ANCA 関連血管炎に対する標準的プロトコールの有用性を明らかにする前向き臨床試験を施行中である。2)JMAAV 試験推進委員会が設立され、その下部組織が編成された。各事項を検討中である。3)疾患の改名と特定疾患への編入についてと皮膚型 PN の概念の確立について検討した。以上の 3 項目を中心に研究し、かつ中・小型血管炎の活動性評価、寛解・再発の定義についても検討した。

A. 研究目的・B. 方法・C. 結果： 試験に登録された。これ等の症例は、難治性血管炎班の提唱している臨床病型に分類され、これ等の病型に沿った治療方針に従って治療が施行されている。血液を集積すると共に、臨床成績 (BVAS、VDI、SF-36 など) を記録し、将来の解析に備

1)MPO-ANCA 関連血管炎に対する標準的プロトコールの有用性を明らかにする前向き臨床試験
 尾崎主任研究者を中心として、分科会員、研究協力者の下に、52 例がこの臨床

えている。

2) JMAAV (Japan study group for MPO-ANCA Associated Vasculitis) 試験推進委員会

尾崎承一主任研究者を委員長として設立された。この下部組織として、疾患活動性委員会、腎臓病理検討委員会、肺病変検討委員会、合併症検討委員会、トランスクリプトーム委員会が組織された。各班員はいずれかの委員会に属し、鋭意各事項を検討している。中林が委員長である活動性評価委員会では、BVAS、VDIを前向きに検討し、本邦症例にこれ等の評価指標が問題なく適用できるか否かを検討している。かつ活動性評価に関しては、疾患の寛解、再発の定義を明確にしておく必要もあるので、研究した。BVASは湯村班員が、VDIは小林班員が担当し、その結果を本班会議で発表した。寛解・再発に関しては、委員会の委員（中林公正、吉田雅治、吉田俊治、原まさ子、住田孝之、臼井崇、有村義宏）の意見を参考に、以下のごとく定義した。

寛解の定義

(1) 完全寛解と不完全寛解に分ける

完全寛解：血管炎による4週間以内の新しい疾患活動性病変を認めず、かつBVASが0~1点である。腎炎に関しては、腎炎所見・腎機能の悪化を認めず、かつ赤血球円柱が消失している状態を言う。CRPは正常値。尚、尿路感染による所見は除外する。

不完全寛解：血管炎による4週間以内の新しい疾患活動性や悪化を示唆する臨床症状や検査成績を認めない状態を言う。BVASは2点以下。

(2) 再発の定義

血管炎による疾患活動性の再燃を示唆する臨床成績及び検査成績が出現し、ステロイド薬や免疫抑制薬の増量を必要とする状態を言う（尿所見の赤血球増加、CRPの陽性化、ANCAの上昇などを参考とする）。重症再燃と軽症再燃に分ける。尚、感染症による所見は除外する。

重症再燃：大量のステロイド薬やcyclophosphamideなどの投薬を必要とする状態を言う。

軽症再燃：ステロイドの中等量以下の

増量で治療が可能な状態を言う。

3) 疾患の改名と特定疾患への編入、皮膚型PNの概念の確立

(1) 結節性多発動脈周囲炎を、結節性多発動脈炎と顕微鏡的多発血管炎に分類した。夫々の疾患に対する診断基準も確立された。厚生労働省もこの方針に変更した。

(2) 悪性関節リウマチは、リウマチ性血管炎と改名する。診断基準は従来の基準を用いる。当研究班では承認させたが、厚生労働省の承認はまだ得ていない。

(3) アレルギー性肉芽腫性血管炎は、当面結節性多発動脈周囲炎には編入しない。臨床個人調査票を用いて、何例程度がこの疾患として申請されているかを、調査し、将来に備えることとした。

(4) 皮膚型結節性多発動脈周囲炎の概念の確立と診断基準の作成は、分科会員の古川班員が担当し、その成績を本班会議で発表した。

D. 考察・E. 結論：

上記のごとく諸研究課題を、目下推進中である。最終年度に向けて、一層のデータの集積と解析を行う予定である。

F. 研究発表：

健康保険情報 特になし。

G. 研究発表：

1. 論文発表

1. Hayakawa S, Nakabayashi K, et al: Tubulointerstitial immune complex nephritis in a patient with systemic lupus erythematosus. Clin Exp Nephrology 10:146-151, 2006.

2. Endo T, Nakabayashi K, et al: Matrix metalloproteinase-2, matrix metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the peripheral blood of patients with various glomerular diseases and their implication in pathogenetic lesion: study based on an enzyme-linked assay and immunohistochemical staining. Clin Exp Nephrol 10: 253-261, 2006.

3. 各研究者の項を参照のこと

2) 学会発表

1. 中林公正、他：MPO-ANCA 関連血管炎の臨床病型と生命予後・死因の臨床的解析。

第 50 回日本リウマチ学会総会、長崎、
2006. 4. 23. ～26.

2. 森 由紀子、中林公正、他：当院にお
ける Churg-Strauss 症候群 11 例の臨床
的検討. 第 50 回日本リウマチ学会総会、
長崎、2006. 4. 23. ～26.

3. 軽部美穂、中林公正、他：MPO-ANCA 関
連血管炎に骨髄異形成症候群 (MDS) を合
併した 3 例の検討. 第 50 回日本リウマ
チ学会総会、長崎、2006. 4. 23. ～26.

4. Nakabayashi K, et al: Different
pathological mechanisms of
tubulointerstitial nephritis between
ANCA-associated nephritis and drug-
induced tubulointerstitial nephritis:
study with immunohistochemical
staining. 2006 American Society of
Nephrology Meeting, San Diego, 2006.
11.16～19.

5. 吉原 堅、中林公正、他：MPO-ANCA 関
連血管炎の寛解期における ANCA 値再上
昇の意義に関する検討. 第 49 回日本腎
臓学会総会、東京、2006. 6. 14～16.

6. 各研究者の項を参照のこと

G. 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

なし

顕微鏡的多発血管炎(microscopic polyangiitis : MPA)の Vascular damage index に関する
研究-Retrospective study-

分科会会長	中林公正	杏林大学医学部第一内科	教授
分担研究者	小林茂人	順天堂大学部附属順天堂越谷病院内科	助教授
	湯村和子	東京女子医科大学第4内科	助教授
	吉田俊治	藤田保健衛生大学医学部リウマチ膠原病内科	教授
	吉田雅治	東京医科大学八王子医療センター腎臓内科	教授
	天野宏一	埼玉医科大学総合医療センターリウマチ・膠原病内科	助教授
	古川福実	和歌山県立医科大学皮膚科学	教授
	槇野博史	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科腎・免疫・内分泌代謝内科学	教授
	山田秀裕	聖マリアンナ医科大学リウマチ・膠原病・アレルギー内科	助教授

研究要旨

顕微鏡的多発血管炎(microscopic polyangiitis : MPA)を対象に多施設にて、 Vascular damage index(VDI)を後ろ向きに検討した。MPA の発症時または治療前(VDI-1)の VDI は median 3.3(range 0~11,n=67)、治療後4 (0-11)、治療後または最終観察時 VDI(VDI-2) は 4.5 (range 1~10,n=22)であった。死亡症例(n=11)は高い傾向を示した。興味あることは、VDI-1 では、肺線維症/空洞病変、GFR50%未満、蛋白尿 0.5g/日の順に多く(n=67)、VDI-2 では、認知障害、白内障、精神症状の順に多かった(n=55)。血管炎やその治療に起因する臓器障害が VDI 評価によって明らかになった。治療合併症に対する対策が検討されることが必要であることが理解された。

研究協力者 (名簿順)

稲葉 裕 (順天堂大学医学部衛生学)
白井 崇(京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学)
遠藤平仁(北里大学医学部膠原病・感染内科学)

大曾根康夫 (川崎市立川崎病院内科)
兼岡秀俊 (福岡大学医学部内科学第四)
菊地弘敏 (帝京大学医学部附属病院内科)
熊谷俊一 (神戸大学大学院医学系研究科臨床病態・免疫学)
黒沢美智子 (順天堂大学医学部衛生学)
小池隆夫 (北海道大学大学院医学研究科病態内科学講座・第二内科)
鈴木康夫 (東海大学医学部内科学系リウマチ内科学)
住田孝之 (筑波大学大学院人間総合科学研究科先端応用医学専攻臨床免疫学)
岳野光洋 (横浜市立大学リウマチ・血液・感染症内科)
八田和夫 (天理よろづ相談所病院総合内科)

原まさ子 (東京女子医科大学付属膠原病リウマチ痛風センター)
武曾恵理 (財団法人田附興風会医学研究所北野病院腎臓内科)

A. 研究目的

MPA は MPO-ANCA が陽性となる代表的な血管炎である。血管炎の治療の進歩により生命予後は改善したが、血管炎自体また治療を含む合併症による臓器障害（臓器予後など）が問題である。経時的に全身の非可逆的な障害を評価する方法が vascular damage index (VDI)であり、今回、日本の血管炎患者において、retrospective, multicenter にて VDI の検討を行った。

目的は、1)VDI の特異性：血管炎の有無によって差異が認められるか？ 他の疾患合併によって VDI が影響を受けないか？ 2)MPA が多い日本で使用できる

か?の2点について検討した。

B. 研究方法

①順天堂医院の28症例にて、血管炎の特異性によるVDIの変化および様々な血管炎でのVDIの差異を検討した。②検討時点で、11施設から血管炎の症例、約130症例VDI調査票が集計され、このうち、MPAについて、VDI点数の変化および発症・治療前と治療後のVDI項目(臨床症候)を検討した。

(倫理面への配慮)

解析は過去の患者病歴から行われ、調査票は個人名など患者個人が特定されることが無いように配慮された。

C. 研究結果

①特異性の検討：順天堂医院の代表的4症例解析では、血管炎に起因しない合併症が生じてもVDIは増加しなかった(表1、上段)。血管炎の経過中にVDIが増加した(表2、下段)。順天堂医院の血管炎28症例で、臨床上活動性のあるMPA11症例ではVDIが増加し、活動性のないMPA3症例ではVDIの増加は認めなかった。血管炎の種類が異なるとVDIも異なる傾向があった(表2)。この結果は、VDIの問題点であるのか、疾患の特徴であるのか今後検討する必要がある。

②VDI変化の検討：多施設から得られたMPA症例VDIの解析では(今回はMPA症例のみを検討した)、MPA初発時/治療前のVDI(VDI-1)はmedian 3.3(range 0~11, n=67)、治療後4(0-11)、治療後最終観察時VDI(VDI-2)は4.5(range 1~10, n=22)、VDI-2とVDI-1の差異は、median 1(0~9; n=62)。観察期間(月)はmedian 8、1~288、mean 33.4ヶ月。一ヶ月あたりの変化(mean±SD)は、0.187±0.356/Mであった。死亡症例(n=11)ではいずれも高い傾向を示した。

VDI項目の検討：初発時/治療前のVDI(VDI-1)と治療後最終観察時のVDI(VDI-2)項目を集計したところ、VDI-

1では、肺線維症/空洞病変、GFR50%未満、蛋白尿0.5g/日以上に多く(n=67)、VDI-2では、認知障害、白内障、精神症状治療後最終観察時VDI(VDI-2)の順に多かった(n=55)(表3)。両時点で集計された項目が異なり、治療経過にて出現する臓器障害が改めて明らかになった。

D. 考察

少数例での検討であるが、血管炎の進展とともにVDIが増加し、他の合併疾患ではVDIの変化は認められなかった。このため、VDIは血管炎に特異性があることが推定された。海外の報告を参照するとVDI増加値は疾患によって異なることが明らかになった。

MPAにおける発症時・治療前のVDI項目および治療後・最終観察時のVDI項目の頻度の結果(表3)から臨床の現場にて問題において経験する臨床症状・臓器合併症がほぼ合致することから、VDIの評価は日本に多いMPAに対しても使用できると推定された。

基本的な問題点は、VDI評価の正しい理解と経験であり、今後のprospective studyにて、特異性、有用性、問題点が再評価されると考えられる。

今回明らかになった治療に起因するVDI項目(VDI-2)に関して、治療ガイドラインの検討が必要と考えられた。

E. 結論

VDIは血管炎の臓器障害の特異性を表し、国際的に重要な評価基準と考えられた。MPAの重要な臓器病変が改めて明らかになった。治療併発症の問題点と予防に留意することが重要であることが理解された。

表1.
血管炎の有無に関連したDVIの増加の有無

年齢	性	疾患	病態	合併症	入院の	CRP	DVI-1	DVI-2	DVI (1-2)	Month	
					きっかけ						
OH	74	M	MPA	血管炎なし	MI, DM	高CPK	0.5	2	2	0	8
MY	67	F	MPA	治療後	なし	めまい	1.32	2	2	0	36
*他の疾患でもDVIは増加しない。											
SS	58	M	PN	10回目入院	なし	化膿性胆管炎	11.3	4	11	7	228
HT	63	F	CSS	初回治療後入院	心筋梗塞、胃潰瘍	下肢疼痛	5.9	4	7	3	9
*血管炎の悪化・経過に伴ってDVI増加。											

表1. 血管炎の有無に関連したVDIの増加の有無

上段：MPAの経過中、血管炎に起因しない病態で入院したが、発症時VDI(VDI-1)と比べ、発症後、8ヶ月、36ヶ月にて最終観察時のVDI(VDI-2)の増加は認められなかった。下段：血管炎に起因するVDIの増加が認められた。

表2 疾患別DVIの検討

疾患名	n	発症時 VDI	最終観察時 VDI	変化値	経過期間 (月)	変化値/月
MPA	11	2.1	2.5	0.45	35.3	0.013
MPA inactive	3	2.3	2.3	0	18.3	ND
PN	2	2.5	7.0	4.5	132.0	0.34
WG	7	2.3	3.4	1	13.6	0.07
CSS	5	1.6	3.2	1.6	5.2	0.31

(28症例)

表2. 疾患別VDIの増加

発症時VDIと最終観察時VDIの変化を検討した。非活動性MPAと判定した症例ではVDIの増加はなく、活動性のあるMPA症例ではVDIの増加が認められた。観察期間が異なるため、VDI増加値/観察時間(月)を記載した。

MPAの初発・治療開始前の症状(n=67)

肺線維症/空洞所見	31
蛋白尿 0.5g/日以上	26
予測・実測のGFRが \leq 50%未満	24
高血圧	24
末梢神経症状	14
腎不全末期	10
胸膜の線維化	8
呼吸機能検査異常	6
明らかな筋萎縮・筋力低下	4
なし	4
慢性呼吸不全	4
鼻閉・慢性鼻汁分泌	4
糖尿病	3
変形または骨糜爛を伴った関節炎	2
白内障	2
2回目の脳血管障害	1
2度目の心筋梗塞	1
脊椎圧迫骨折	1
横断性脊髄障害	1
狭心症・冠動脈バイパス	1
鞍鼻・鼻中隔穿孔	1
視力低下・複視	1
心外膜炎	1
心筋梗塞	1
心弁膜障害	1
精神障害	1
認知障害	1
脳血管障害	1
肺高血圧	1
皮膚潰瘍	1
腎不全末期	1
慢性副鼻腔炎・X線による骨破壊所見	1
網脈病変	1
難聴	1
計	185

MPA治療開始後の症状(n=55)

認知障害	9
白内障	7
精神症状	7
糖尿病	6
腎不全末期	6
高血圧	5
呼吸機能検査異常	4
脊椎圧迫骨折	3
慢性呼吸不全	3
明らかな筋萎縮・筋力低下	3
予測・実測のGFRが \leq 50%未満	3
脳血管障害	3
末梢神経炎	2
肺線維症/空洞所見	2
難聴	2
なし	2
2回目の脳血管障害	2
無腐性骨壊死	1
腸梗塞	1
蛋白尿 0.5g/日以上	1
心筋梗塞	1
視力低下・複視	1
胸膜線維化	1
悪性腫瘍	1
2度目の心筋梗塞	1
計	77

表3. 発症時・治療前のVDI項目と治療後・最終観察時VDI項目の集計結果

表・左は、発症時・治療前のVDI項目であり、血管炎自体による臓器障害の特徴を表す。
表・右は、治療後・最終観察時のVDI項目であり、主に治療に起因する臓器障害を表すことが推定される。