

来するPECAM-1およびeNOSが有意に高いことから、体外増幅赤芽球移植によって血管の生存が高まったか、および/または一旦血管が減少したあとに血管再生がおこったと考えられる。E-6 + EPO群では組織中のVEGFのmRNA量が有意に高かった。

## 考 察

ヒト骨髄中に存在する赤芽球のうち最も血管新生作用の強い細胞は、ヘモグロビン合成開始前後の未熟な赤芽球であった。このような未熟赤芽球を、少量の骨髄から体外増幅によって得る培養法を樹立した。体外増幅赤芽球の移植による血流改善効果は、従来の骨髄細胞移植より強力であった。本治療法は本学に設置の倫理委員会および本病院に設置のIRBの承認を受け、第I/II相臨床試験を開始し、これまでに本治療法を施行した2例では良好な結果を得ている。また本治療法は米国に設置の臨床試験登録センター“IRISCTN”に公開されている

(<http://www.controlled-trials.com/ISRCTN66803682>)。

これまで広く行われてきた血管再生治療としての、骨髄細胞移植療法の問題点を克服するための研究がいくつか行われている。骨髄には間葉系幹細胞も含まれており、これを体外で増幅培養したものを移植するラットを用いた血管再生実験6、体外増幅した血管内皮前駆細胞の移植を用いたマウスの実験7、および培養によって脱分化させた脂肪細胞の応用は<sup>8</sup>、いずれも前臨床段階の研究であり、今後の臨床応用の報告が待たれる。血管を標的とした治療法および治療薬の開発には複数の方策があり、目的を明確に意識した上での治療法の開発が必要である。

## 文 献

1. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, et al.: 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.

2. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, et al.: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 275: 964 - 967, 1997.

3. Crosby JR, Kaminski WE, Schatteman G, Martin PJ, Raines EW, et al: Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ Res*. 87: 728-730, 2000.

4. Ozawa T, Toba K, Kato K, Minagawa S, Saigawa T, et al.: Erythroid cells play essential roles in angiogenesis by bone marrow cell implantation. *J Mol Cell Cardiol*. 40: 629-638, 2006.

5. Oda M, Kato K, Toba K, Otaki K, Kitajima T, et al.: Prognostic factors of critical limb ischemia after autologous bone marrow implantation. *J Cardiol*. 50: 235-242, 2007.

6. Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Murakami S, et al.: Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. *Cardiovasc Res*. 66: 543-551, 2005.

7. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, et al.: Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97: 3422-3427, 2000.

8. Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, et al.: Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol*. 215: 210-222, 2008.

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業） 研究報告書

## 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  
横浜市立大学大学院医学研究科病態免疫制御内科  
研究協力者 井畑 淳、須田昭子、桐野洋平、浜 真麻、上田敦久、  
岳野光洋、出口治子\*、大野 滋\*、  
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\*

### 研究要旨

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。

我々は、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おり、既に5症例での有効性を報告している。しかし、いずれの症例も強皮症であり、今後の課題として他の膠原病の潰瘍に対する同療法の有用性の確認があげられた。また、最近国内で同療法施行後の動静脈シャントの形成および長期予後不良の報告があったため（1）、我々の症例における長期予後について検討した。

方法としては、腸骨より骨髓液を約400ml採取し、単核球 $1\sim3\times 10^9$  cellsを分離精製後、虚血肢骨格筋内に投与した。

今回全身性エリテマトーデス2例に対し同療法を施行したが、強皮症の6例と同様に良好な治癒が認められた。また、術前・術後の経過中、最長168週まで経過観察を行ったが、重篤な有害事象は認められなかった。

### A. 研究目的

膠原病・リウマチ性疾患における四肢虚血病変に対する自己骨髓幹細胞移植による血管新生療法の有用性、長期予後について検討し、更に適応疾患の拡大の可否について検討した。

### B. 研究方法

#### <対象>

対象となる症例に関しては以前と同様に膠原病・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ものとした。今回は全身性エリテマトーデス2症例に適応疾患を広げて血管新生療法を行ったためこれらについて以下に病歴を記す。

症例7；59才、女性。1974年SLEと診断。2002年左足趾にチアノーゼ・潰瘍を生じ切断。2004年抗リン脂質抗体症候群と診断。2006年9月14日左第一趾潰瘍改善なく、当科紹介受診。初診時ステロイドは使用されていなかった。外来にてリポPGE1製剤投与するも改善なく、12月4日血管新生療法目的で入院。四肢:左第1趾に潰瘍(+),左第2.3.4趾は切断,右第2.3趾紫色調,足背動

脈:左触知せず, 神経学的所見:特記すべき事なし。

症例8;32歳、女性。1993年SLEと診断。PSL30mg/日で治療開始し, 1998年PSL中止。2001年出産後再燃。PSL30mg/日再開され, 症状改善し, PSL17.5mg/日へ漸減。2006年9月レイノー現象が悪化。10月末, 左第5指指尖部の壊死出現。リポPGE1製剤投与するも改善なく, 2007年1月29日血管新生療法目的で入院。四肢:両手指冷感, チアノーゼ, 左第2指, 5指, 右第5指に潰瘍。神経学的所見:特記すべき事なし。

#### <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>

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、採取。Bone Marrow Collection Kit (Baxter) 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、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、

その後は24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）、毛細血管顕微鏡などのデータを解析した。

### C. 研究結果

#### <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6例および全身性エリテマトーデス2例であり、年齢は32~72歳、全て女性であった。罹病期間は5~22年であった。（表1）

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。どの症例も基礎疾患の活動性は低かった。

#### <移植後の経過>

##### <骨髓細胞数およびCD34陽性率の解析>

表2に示すように採取した骨髓液量および骨髓細胞数は、それぞれ390-557 mlおよび $5.4-107.8 \times 10^9$  cellsであった。実際に一患肢あたり移植した生細胞数は $0.79-2.54 \times 10^9$  cellsであり、このうちCD34陽性細胞は、 $0.46-7.58 \times 10^7$  cellsであった。

##### <移植後の臨床経過について>

移植後の経過観察期間中（12ヶ月~3年7ヶ月）、移植前に認めた皮膚潰瘍は全例で上皮化した。血管新生療法を施行した症例の皮膚潰瘍の大きさの変化を図1Aに示す。移植後24週以内に潰瘍は治癒し、その後最長168週までの経過観察でも再発は認められていない。この傾向は新たに追加したSLEの症例においても同様であった。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（症例6）、同一肢に再度移植を行うことで速やかな潰瘍の治癒を認めた。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。

皮膚潰瘍の治癒経過と疼痛の指標であるVASの関係を図1Bに示すが、潰瘍の縮小とともに、VASの軽減が認められた。症例7において24週にVASの上昇が認められるが、これは他肢に生じた潰瘍が影響したものと考えられる。レイノー現象に関しても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。

#### <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。

#### 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6症例および全身性エリテマトーデス2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、速やかな疼痛の軽減および潰瘍の治癒が認められた。

全身性強皮症の病態においては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おり(2)、血管内皮細胞の傷害と血流低下が潰瘍の形成機転と考えられる。しかし、他の膠原病において潰瘍が生じる機序は明らかではなく、全身性エリテマトーデスのように血管炎が関与している可能性がある場合の血管新生療法への潰瘍治癒への反応性はこれまでの強皮症のものとは異なるかもしれなかった。我々の経験した2症例において潰瘍の治癒経過はほぼ今までの報告と同様であり、原疾患の活動性の悪化も経過中認められなかった。今回の2症例は抗RNP抗体が陽性であった。潰瘍の形成機序と自己抗体との関係については今回の報告では検討されていないが今後の興味深い課題と考えられた。

表3に血管新生療法後の臨床経過を示した。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。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、膠原病患者において必要があれば複数回の

移植も可能であると考えられた。

最近わが国の施設において血管新生療法の長期安全性に対して疑問を投げかける報告が認められた(1)。しかし、我々の症例を検討した結果では最長172週、のべ804週の観察において重篤と考えられる合併症は認められなかった。

しかし、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. 結語

全身性強皮症および全身性エリテマトーデス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、長期経過観察においても安全性、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. 文献、

1) Miyamoto K, Nishigami K, Nagaya N, et al.

Unblinded pilot study of autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells in patients with thromboangiitis obliterans. *Circulation* 2006;114(24):2679-84.

2) Kuwana M, Okazaki Y, Yasuoka H, Kawakami Y, Ikeda Y. Defective vasculogenesis in systemic sclerosis. *Lancet*. Aug 14-20;364(9434):603-10, 2004

表1 各症例の臨床的特徴

	症例 1	症例 2	症例 3	症例 4	症例 5	症例 6	症例 7	症例 8
年齢 (yr) / 性別	63 / F	50 / F	57 / F	72 / F	62 / F	58 / F	59 / F	32 / F
罹病期間 (yr)	22	5	19	22	5	19	33	14
<b>自覚症状</b>								
Raynaud現象	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
m-Rodnan TSS (0-51)	27	8	32	9	18	32		
SHAQ (0-60)	0	6	30	13	2	40	10	15
<b>臓器合併症</b>								
cardio-pulmonary	(-)	(-)	(-)	(-)	IP	(-)	(-)	(-)
gastro-intestinal	GERD	(-)	GERD/PBC	(-)	GERD	GERD/PBC	(-)	(-)
<b>自己抗体</b>								
ANA	1280 dis sp	1280 dis sp	1280 dis sp	1280 dis sp	1280 dis sp	1280 dis sp	1280 sp	320 sp
anti-centromere	140.1	136.0	189.3	89.9	< 7.0	89.9	< 7.0	< 7.0
anti-Scl 70	< 7.0	< 7.0	< 7.0	8.9	< 7.0	8.9	< 7.0	< 7.0
anti-RNP							2680	246
<b>血管新生までの治療法</b>								
PSL	(-)	(-)	5mg / day	(-)	8mg / day	(-)	(-)	15mg / day
prostaglandin	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

表2 採取骨髓液中のCD34陽性細胞数および移植した細胞数

	症例 1	症例 2	症例 3	症例 4	症例 5	症例 6	症例 7	症例 8
採取骨髓液量 (ml)	490	390	405	390	420	390	400	557
骨髓単核球細胞数 ( $10^4 / \mu\text{L}$ )	1.96	1.39	1.64	1.88	2.03	6.25	7.62	19.35
CD34 <sup>+</sup> 細胞 / $\mu\text{L}$ (%)	3790 (2.22)	230 (0.44)	1970 (2.49)	2210 (4.10)	1620 (1.74)	1265 (3.2)	945 (2.15)	2720 (2.14)
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	0.79	0.87	2.54
移植されたCD34 <sup>+</sup> 生細胞数( $10^7$ cells)	7.58	0.46	3.94	4.42	3.01	2.53	1.89	5.44

表3 治療経過のまとめ

	症例 1	症例 2	症例 3	症例 4	症例 5	症例 6	症例 7	症例 8
フォローアップ期間(月)	43	34	33	32	19	14	14	12
皮膚潰瘍の転帰	上皮化	上皮化	上皮化	上皮化	上皮化	上皮化	上皮化	上皮化
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	なし	悪心	発熱
レイノー現象の出現	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり
LipoPGE <sub>1</sub> の使用	あり	あり	あり	あり	なし	なし	なし	なし
皮膚潰瘍の再発	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし

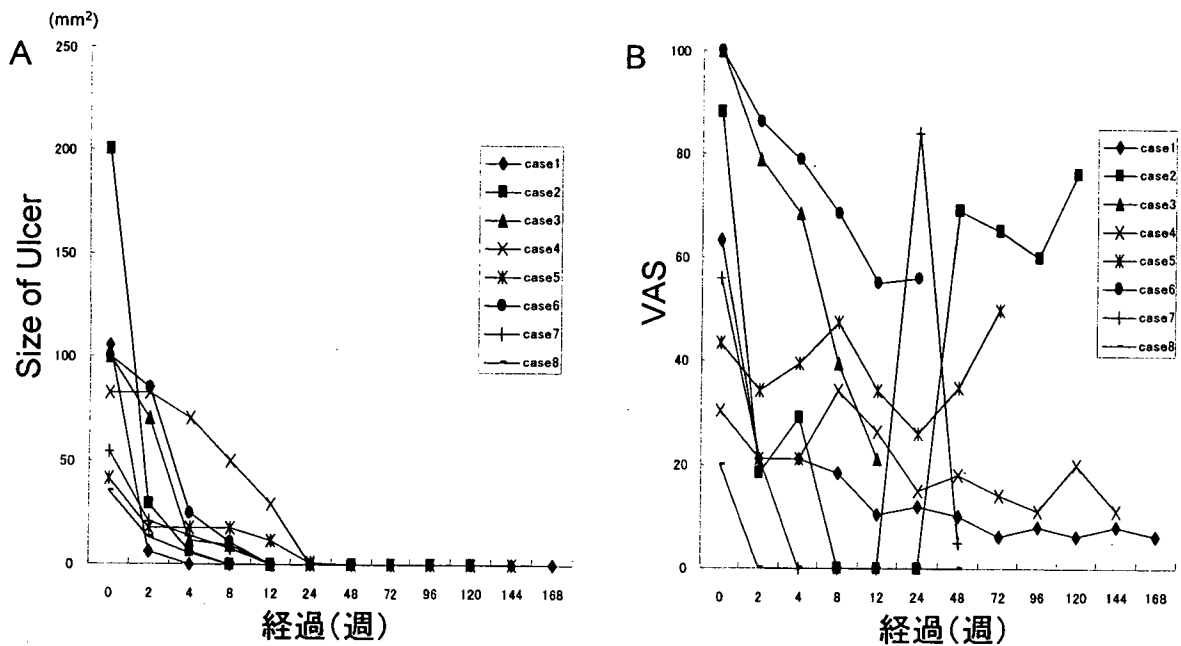


図1 Aは移植開始から現在までの潰瘍の大きさの変化、BはVASの変化を示す。

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業） 研究報告書

## 治療抵抗性末梢動脈疾患(PAD)に対する先進併用療法 —自己骨髄幹細胞血管新生療法, マゴットセラピー, 高気圧酸素療法(HBO)併用療法—

分担研究者 宮本 正章  
日本医科大学大学院器官機能病態内科学 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、膠原病等難治性血管炎）46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による血管新生療法を施行し、その有効性及び安全性を示した。また術前予後予測因子として100%O<sub>2</sub>吸入下経皮酸素分圧測定(TcPO<sub>2</sub>)測定により30mmHg以下症例の予後不良を報告し、これらを改善するため自己骨髄幹細胞血管新生療法、マゴットセラピー、高気圧酸素療法(HBO)併用先進療法を開発し、前医で患肢大切断或いは治療法がないと診断された症例の59例中51例（86.4%）で、患肢大切断を回避し、自立歩行で退院した。また、大きな副作用も認められなかった。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)治療抵抗性虚血下肢（バージャー病、ASO、糖尿病潰瘍・壊疽、膠原病等難治性血管炎）に対する自己骨髄幹細胞移植による血管再生療法及びマゴットセラピー、高気圧酸素療法(HBO)併用先進療法の有効性、安全性を証明する。

### 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 $\mu$ l及び200 $\mu$ 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、マゴットセラピー後の潰瘍・壊疽周辺に筋注した。

（倫理面への配慮）

（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診療科代表者8人）よりなる血管再生療法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、94.9%が3度(56/59例)を占め、糖尿病は74.6%（44/59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 78.3 $\pm$ 16.3 (mm)に対して術後4週で12.1 $\pm$ 9.6 (mm)と著明に低下していた(p<0.0001)。ABIは、術前 0.54 $\pm$ 0.20 から術後4週で 0.79 $\pm$ 0.24 (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122±42秒から術後4週で491±73秒と大幅に改善した。(p=0.028)

#### 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。59例中8例では、術後2年以内に患肢大切断を余儀なくされた(全て壊死性筋膜炎、骨髄炎が原因であった)。

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(TcPO<sub>2</sub>)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、TcPO<sub>2</sub>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TCPO<sub>2</sub>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治療抵抗性虚血下肢(バージャー病、ASO,糖尿病潰瘍・壊疽、膠原病等難治性血管炎)に対する自己骨髄幹細胞移植による血管再生療法及びマゴットセラピー、高気圧酸素療法(HBO)併用先進療法)を59例実施し、その有効性及び安全性を示した。<sup>99m</sup>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) Gen Takagi, Masaaki Miyamoto, Masahiro Yasutake et al, A novel therapy using control-released basic fibroblast growth factor in Patients with peripheral artery disease : Comparison with bone marrow mononuclear Cell implantation. Circulation Supplement II 114 II-446, 2006
- 2) Takayuki Aimoto, Eiji Uchida, Akira Matsushita et al, Controlled release of basic fibroblast growth factor promotes healing of the pancreatico jejunal anastomosis: A novel approach toward zero pancreatic fistula. Surgery 142,734-740, 2007
- 3) Masayuki Arakawa, Masahiro Yasutake, Masaaki Miyamoto, et al : Transduction of anti-cell death protein FNK protects isolated rat hearts from myocardial infarction induced by ischemia /reperfusion. Life Science, 80 2076- 2084, 2007
- 4) Shuhei Tara, Masaaki Miyamoto, Sadamitsu Asoh, et al. Transduction of the anti-apoptotic PTD-FNK protein improves the efficiency of transplantation of bone marrow mononuclear cells. J of Molecular and Cellular Cardiology 42,489-497, 2007
- 5) Takagi Ikuyo, Nejima Jun, Takagi Gen, et al. 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. 学会発表

- 1) 宮本正章、高木 元、太良修平、他、膠原病による難治性潰瘍に対する再生医療を応用



した集学的治療－血管新生からマゴットセラピーまで- 第19回日本アレルギー学会春季臨床大会 横浜 2007. 4 シンポジウム10 膠原病治療の現状と評価

- 2) 宮本正章、水野博司、多川政弘、他  
難治性末梢動脈閉塞性疾患（PAD）に対する総合的治療戦略－血管新生療法からマゴットセラピーまで-第32回日本足の外科学会学術集会 長崎 2007. 6 アフタヌーンセミナー (1)
- 3) 宮本正章、安武正弘、高木 元、他  
血管再生医療を応用した難治性PADに対する総合的治療戦略－自己骨髄血管新生療法からマゴットセラピーまで-  
第11回心筋・血管新生療法研究会 東京 2007.
- 4) 宮本正章、水野博司、多川政弘、他  
重症PADに対する総合的治療戦略  
－血管新生療法からマゴットセラピーまで-  
第23回日本医工学治療学会学術大会 シンポジウム 末梢動脈疾患PADのすべて 集学的治療の実際 大阪 2007. 2
- 5) 宮本正章、水野博司、多川政弘、他  
重症難治性PADに対する総合的治療戦略－血管新生療法からマゴットセラピーまで-第71回日本循環器病学会総会学術集会 教育講演 神戸 2007. 3
- 6) 相本隆幸、内田英二、田尻 孝、他  
生体修復材料を用いた膵消化管吻合術  
基礎的研究：再生医療による新しい手技  
第19回日本肝胆膵外科学会学術集会  
ミニワークショップ 2 移植・再生医療 横浜 2007. 6

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

2007 特許出願、商標登録出願  
マゴットバッグ

1. 実用新案登録  
なし
2. その他  
なし

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業） 研究報告書

## 難治性血管炎に対する血管再生医療の多施設共同研究

分担研究者 藤本 和輝  
研究協力者 宮尾 雄治、田中 朋子、福嶋 隆一郎、原田 恵実  
国立病院機構熊本医療センター  
心臓血管センター内科

### 研究要旨

【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、自己骨髄単核球移植を用いた、血管再生療法が臨床応用されるようになった。難治性血管炎で、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髄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】難治性血管炎で、他に治療法が無い末梢血行障害を認める患者10例（バージャー病 7例、膠原病 3例（結節性多発性動脈炎 2例、強皮症 1例）、24肢、男性6例、女性4例、平均年齢53.2±16.2歳。

【方法】全身麻酔下に腸骨から骨髄液を採取し、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：バージャー病の1例で、血管再生療法で完全に良くなったが、再度、悪化した。ただし、血管再生療法後、一切の治療を自己中止し、喫煙も再開していた。4：その他の症例は、平均約23ヶ月経過観察でしているが、症状の悪化を認めず、維持できている。

【結語】1：自己骨髄幹細胞移植による血管再生療法は、難治性血管炎（バージャー病、膠原病）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：ただし、基礎疾患に対する治療を、継続して行うことが必要である。

### はじめに

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、自己骨髄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、難治性血管炎（バージャー病、膠原病）で他に治療法が無い末梢血行障害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髄液を採取し、単核球を濃縮分離し、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

難治性血管炎で他に治療法が無い末梢血行障害を認める患者10例（バージャー病 7例、膠原病 3例（結節性多発性動脈炎 2例、強皮症 1例）、24肢、男性6例、女性4例、平均年齢53.2±16.2歳。（表1）

表1. 難治性血管炎

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	57	バージャー病	両上肢、左下肢
5	女性	41	バージャー病	四肢
6	女性	68	強皮症	左上肢、両下肢
7	男性	74	バージャー病	両下肢
8	女性	39	バージャー病	右下肢
9	男性	66	バージャー病	両下肢
10	女性	60	結節性多発性動脈炎	両上肢、右下肢

結果

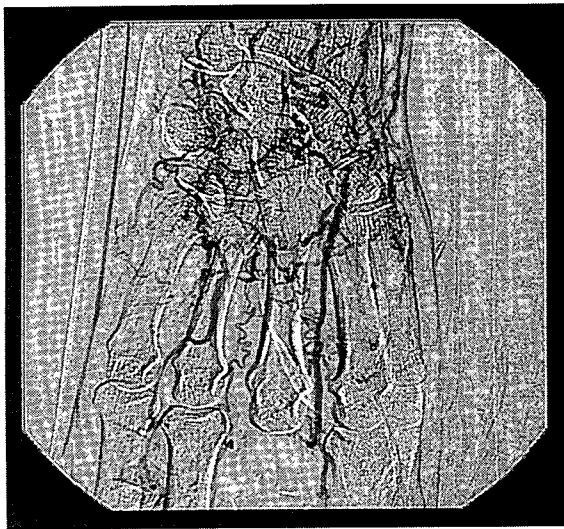
全例、翌日から自覚症状（冷感、疼痛）の改善を認め、完全に消失した。

壊疽を認めた4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10は、治癒傾向）。

症例8は、血管再生療法で完全に良くなったが、再度、悪化した。ただし、血管再生療法後、一切の治療を自己中止し、喫煙も再開していた。

表2. 結果

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	57	バージャー病	両上肢、左下肢	傷治癒、自覚症状消失
5	女性	41	バージャー病	四肢	自覚症状消失
6	女性	68	強皮症	左上肢、両下肢	傷治癒、自覚症状消失
7	男性	74	バージャー病	両下肢	自覚症状消失
8	女性	39	バージャー病	右下肢	自覚症状消失
9	男性	66	バージャー病	両下肢	自覚症状消失
10	女性	60	結節性多発性動脈炎	両上肢、右下肢	治癒傾向



治療前

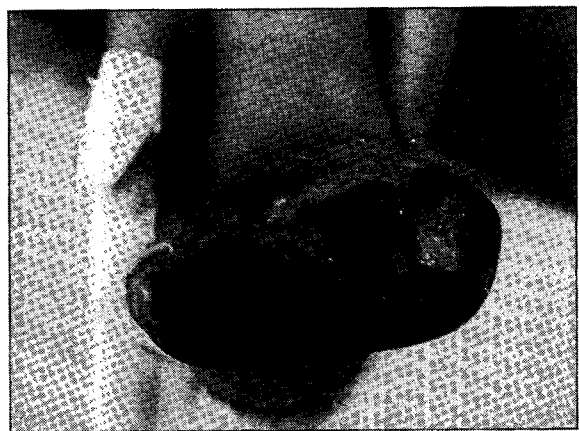


治療後

図1 バージャー病 (症例1)



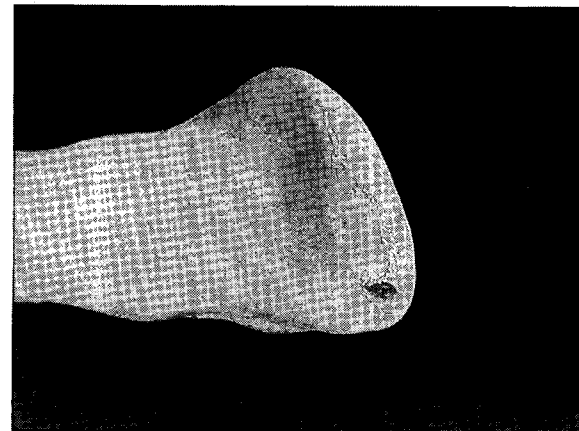
入院時



治療前

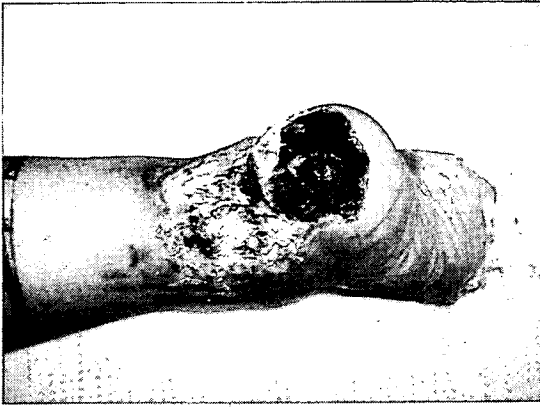


6ヶ月後



1年後

図2 結節性多発動脈炎 (症例2)



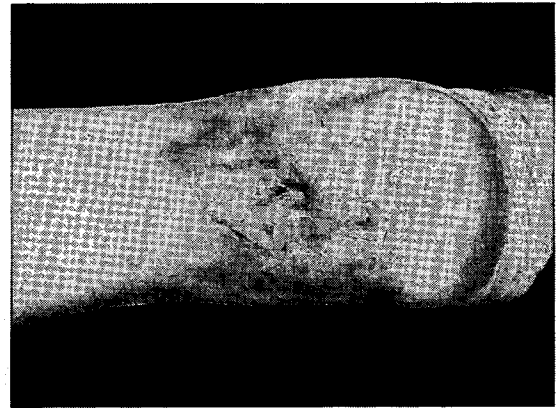
治療前



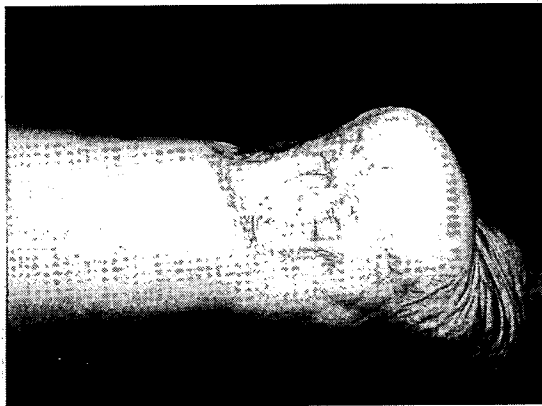
1ヶ月後



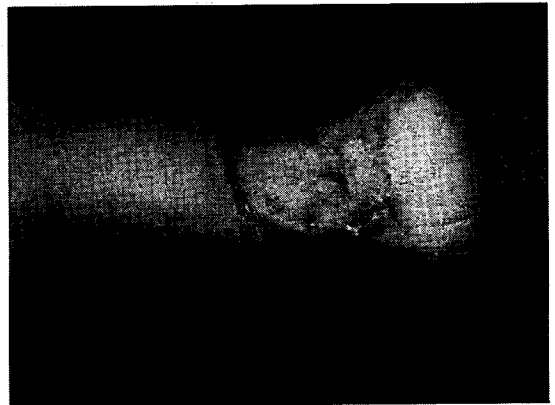
2ヶ月後



3ヶ月後

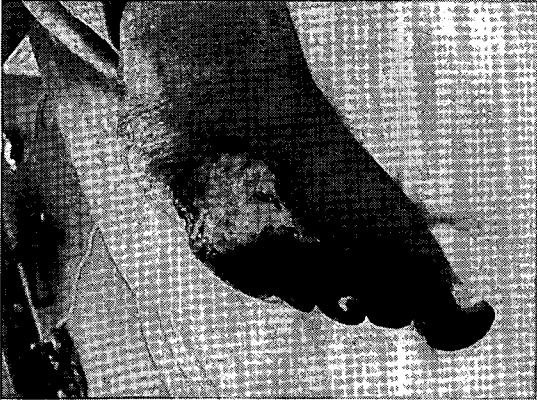


6ヶ月後

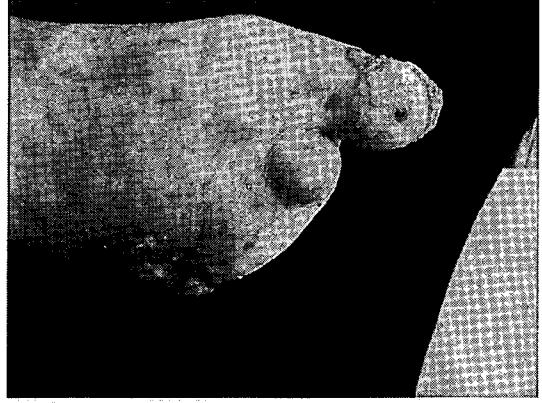


1年後

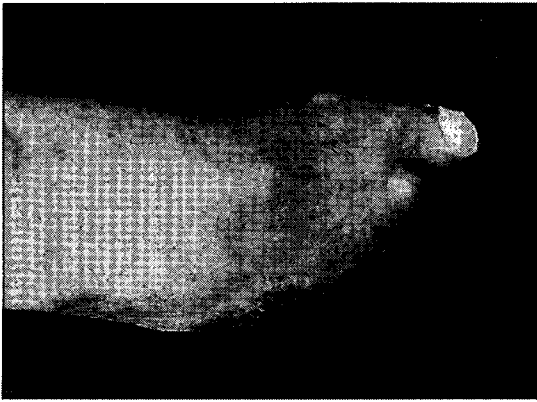
図3 強皮症 左下肢 (症例6)



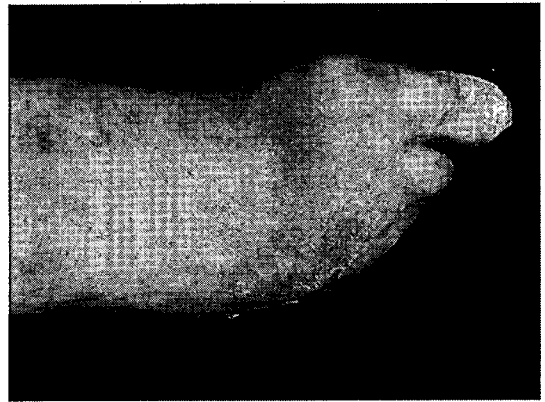
治療前



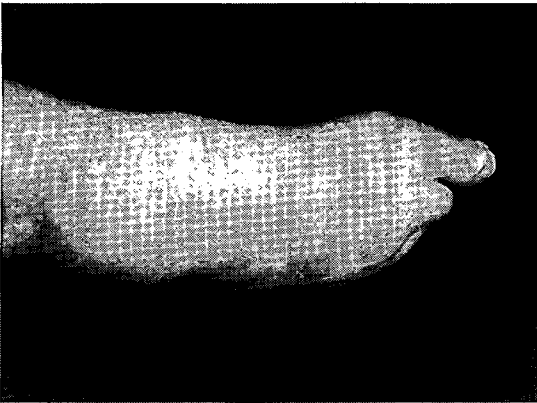
1ヶ月後



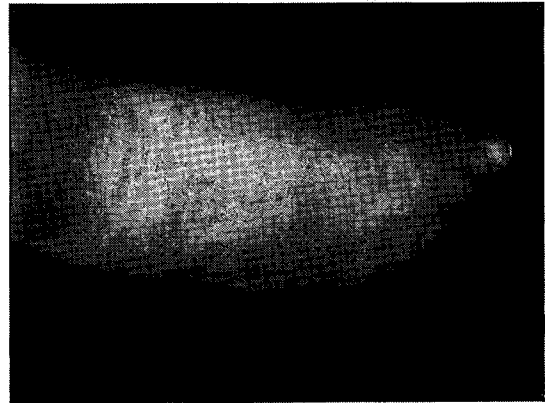
2ヶ月後



3ヶ月後



6ヶ月後



1年後

図3 強皮症 右下肢（症例6）

## 考察

難治性血管炎で、他に治療法が無い末梢血行障害を認める患者は、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、に対しても、非常に有効であった。

バージャー病の1例で、血管再生療法で完全に良くなったが、再度、悪化した。ただし、血管再生療法後、一切の治療を自己中止し、喫煙も再開していた。治療効果を維持するために、バージャー病も、基礎的な治療、禁煙は不可欠である。

膠原病に関しては、血管再生療法で原疾患が良くなるわけでないので、再発等の長期予後に関しては、まったく不明である。しかしながら、膠原病（結節性多発性動脈炎 1例、強皮症 1例）で、従来の治療は、まったく無効で、もし血管再生療法を行わなければ、major amputationとなった症例を、minor amputationで回避でき、独歩退院でき、2年11ヶ月、1年11ヶ月悪化を認めないような治療をできた血管再生療法は、すばらしい治療である。

ただし、わずか3例であるので、長期予後を含め今後の研究が必要である。

## 結語

- 1：自己骨髄幹細胞移植による血管再生療法は、難治性血管炎（バージャー病、膠原病）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：ただし、基礎疾患に対する治療を、継続して行うことが必要である。

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業） 研究報告書

## 難治性血管炎に対する末梢血幹細胞治療

分担研究者 堀江 卓  
特定医療法人北楡会 札幌北楡病院 外科

### 研究要旨

当院では平成13年12月以来、四肢の末梢血管障害の患者に、末梢血幹細胞（PBSC）による血管再生治療を行ってきた。135例に行い、79例は救肢された。そのうち難治性血管炎の患者は10例（SLE 7例、バージャー 2例、MCTD 1例）で、8例が救肢された。

### はじめに

今回の臨床研究の目的は、四肢の末梢血管障害の患者に末梢血幹細胞（CD34陽性細胞）を局所注射して末梢血管の再生を図ることである。

すでに室原<sup>1)</sup>、松原<sup>2)</sup>、および Tateishi-Yuyama<sup>3)</sup>らにより、ASOの患者に骨髓移植法に準じて骨髓単核球を $1 \times 10^9$ 個<sup>1)</sup>採取分離し、虚血下腿屈側骨格筋内に移植後、1ヶ月で血流の回復、疼痛の軽減を認めたとの報告はある。ただし、骨髓採取には全身麻酔や自己血輸血が必要で、患者の負担が大きい。そこで、血管内皮前駆細胞<sup>1)</sup>と考えられるCD34陽性細胞を骨髓からではなくアフレスシスによる末梢血採取法（PBSCC）<sup>4)</sup>により調整した。さらに、採取液からCD34陽性細胞のみを純化<sup>5)6)</sup>しようとする回に数十万円ほどの試薬が必要となる。採取液中には赤血球、単核球および血小板が混在しているが、 $1 \times 10^7$ 個以上のCD34陽性細胞が含まれていれば、採取液をそのまま筋注することにした。

あわせて、難治性血管炎と閉塞性動脈症との治療成績を比較した。

### 対象と方法

四肢末梢血管血行障害の患者を対象とした。重篤な虚血性心疾患と脳血管障害のないことを、循内受診、脳CT等で確認した。次いで、G-CSF  $5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を4日間毎日皮下注した。透析患者は透析後に投与した。毎日検血を行い、白血球数が5万を越えたら $2.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ に減量した。4日目にPBSCCをCS-3000またはSpectraを用いて行った。非透析患者はWルーメンカテーテルを挿入し、また透析患者はシャント血管を用いた。採取されたCD34陽性細胞数をフローサイトメトリー（FACScan）で計測した。同日中に採取液を患肢に1ヶ所0.5~1.0mlずつ23G針を用いて筋注した。麻酔は、上肢は腕神経叢ブロック、下肢は腰麻によった。術後1週間は白血球数や凝固系の変動を観察した。治療効果の判定には、自覚症状、プレチスモグラフ、サーモグラフ、ABI（足関節/上腕血圧比）、3D-CTおよび血流造影によった。

### 結果

平成13年12月以降現在までに135例に行った。そのうち、難治性血管炎（A群）は10例で、SLE 7例、バージャー 2例、MCTDが1例だった。平均年齢はA群 40.7才、ASO等（B群、125例）

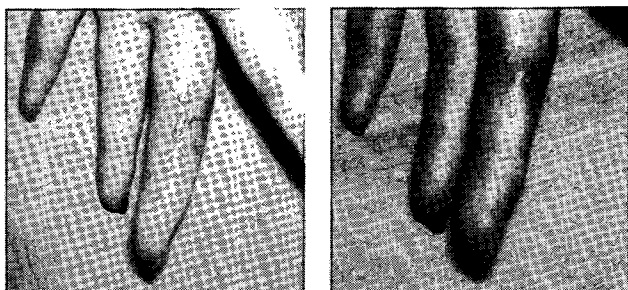


67.5才で、男女比はA群3：7、B群93：32とA群で女性が多かった。血液透析患者は、A群1例、B群92例、糖尿病はA群0、B群89例と、いずれもA群で少なかった。ステロイド投与はA群7例、B群10例とA群が多かった。A群で足に治療したのが7例、手が3例、B群では足が118例、手が8例で、A群は手の症例が多かった。Fontaine分類では、A群はI度1例、III度1例、IV度8例で、B群ではI度8例、II度22例、III度22例、IV度73例で、A群でIV度が多かった。壊疽もA群10

例中4例、B群125例中44例と、A群が多かった。移植したCD34陽性細胞数はA群で $2.2 \times 10^7$ 個、B群で $3.5 \times 10^7$ 個とB群が多かった(表)。

表 末梢血幹細胞採取

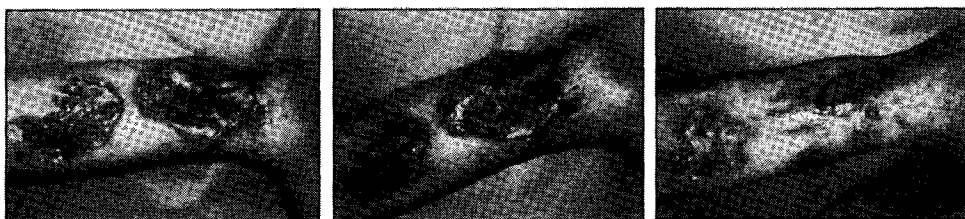
	n	白血球数	単核球数	CD34陽性細胞数
A群	10	$3.6 \times 10^4$	$1.3 \times 10^{10}$	$2.2 \times 10^7$
B群	125	$3.5 \times 10^4$	$1.7 \times 10^{10}$	$3.5 \times 10^7$



治療前

2ヶ月後

図1 症例73 25才 女性 SLE



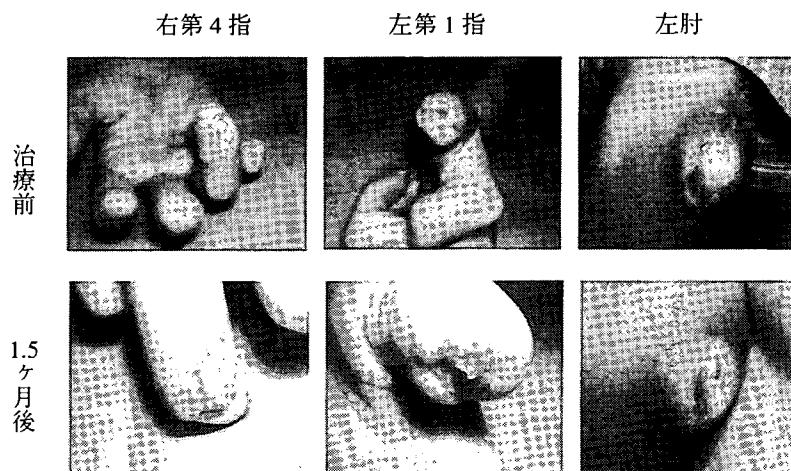
治療前

1ヶ月後

アキレス腱切除  
6ヶ月後

8.5ヶ月後

図2 症例96 39才 女性 SLE



治療前

1.5ヶ月後

右第4指

左第1指

左肘

図3 症例112 40才 女性 SLE

治療成績は、A群で改善が2例、変化なし6例、切断2例（小切断1例）、B群では改善39例、変化なし33例、切断53例（小切断13例）で、救肢率はA群で80%、B群で58%とA群が高かった。

症例73は25才、女性。左第3指の難治性潰瘍あり、細胞治療を行った。左前腕から手に66ヶ所、あわせて $1.1 \times 10^7$ 個のCD34陽性細胞を筋注した。2ヶ月後に潰瘍は消失、37.5ヶ月後も経過良好である（図1）。

症例96は39才、女性。右下腿に巨大な潰瘍あり、アキレス腱も露出していた。右足に多く65ヶ所 $2.5 \times 10^7$ 個のCD34陽性細胞を筋注して、潰瘍は縮小したが、30ヶ月後も小潰瘍は残っている（図2）。

症例112は40才、女性。両手と左肘に潰瘍を認めて、両上肢に88ヶ所、 $1.7 \times 10^7$ 個の細胞を筋注した。潰瘍は消失したが、20ヶ月後、左第3指を切断、20.5ヶ月後肺高血圧症を認めた（図3）。

## 考察

Isner<sup>7)</sup>、Asahara<sup>8)</sup>、Shintani<sup>9)</sup>、室原<sup>1)</sup>らは、1997年頃よりCD34陽性細胞の分画中に血管内皮前駆細胞が存在し、これは骨髄に由来し、虚血肢における血管新生に関与することを実験的に明らかにした。さらに、細胞移植による血管再生療法の臨床応用も2000年より、室原<sup>1)</sup>、松原<sup>2)</sup>およびTateishi-Yuyama<sup>3)</sup>らにより開始された。CD34陽性細胞は末梢血より骨髄に豊富に存在することから、全麻下に自己骨髄液を500~600ml採取し、比重遠心分離法（CS-3000による）にて骨髄単核球を分離した。約 $1 \times 10^9$ 個を虚血肢に筋注した。経過良好で最長14ヶ月<sup>2)</sup>下肢の血流増加は保たれた。また、稲葉<sup>5) 6)</sup>らは、2001年頃よりCD34陽性細胞を骨髄からではなく末梢血よりPBSCCにて採取し、さらに免疫磁気ビーズ法を用いて純化して患肢に筋注した。細胞数は $1 \sim 4 \times 10^7$ 個で術後経過良好であった。症状の改善には $1 \times 10^7$ 個で十分とされた。

一方、高倉<sup>10)</sup>らは、血管新生のメカニズムは内皮前駆細胞ばかりでなく骨髄や末梢血中の血液細胞そのものが内皮細胞に成長因子を供給

して血管新生を促すとした。また、Asahara<sup>8)</sup>は、実験的にCD34陽性細胞と陰性細胞とを一緒に培養することでCD34陽性細胞の血管内皮細胞への分化が促進されるとした。

今回、稲葉<sup>5) 6)</sup>らの方法に準じてCD34陽性細胞を末梢血より採取したが、純化は行わなかった。 $1 \times 10^7$ 個以上採取されていれば他の血液細胞が混入していても問題はなく、また血管再生に有効と考えた<sup>11)</sup>。

難治性血管炎の患者は、135例中10例と少なかった。ASOを代表とする動脈硬化性の病変とは明らかに異なり、治療成績も良い。年齢が若く、女性に多い、透析や糖尿病の合併はほとんどなく、手の病変の比率が高い。ステロイドを内服している。Fontaine IV度で壊疽の割合が高く、また採取されたCD34陽性細胞は少ないものの、救肢率は高かった。年齢が若いのに採取細胞数が少ないのは、膠原病ないしステロイドのせいかもしれない。また、治療成績の差は、血管炎と動脈硬化の違いによるものと考えますが、詳細は不明で今後の課題である。成績良好なことより、難治性血管炎は血管再生治療の適応疾患と考える。

## 文献

- 1) 室原豊明、新谷理、明石英俊、吉本幸治、今泉勉. 細胞移植による血管新生療法. 実験医学 19: 847-853, 2001
- 2) 松原弘明、正木浩哉、湯山恵里子、天野克也、岩坂壽二、室原豊明、今泉勉、池田宇一、鳥田和幸. 閉塞性動脈硬化症への血管内皮幹細胞移植による血管再生治療. 呼と循 50: 349-355, 2002
- 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 ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. Lancet 360: 427-435, 2002
- 4) 関口定美、池淵研二. 末梢血幹細胞採取.

- (日本アフェレシス学会編) アフェレシスマニユアル. p.105-110、秀潤社、東京、1999年
- 5) 稲葉頌一、古森公浩、江頭健輔. 末梢血幹細胞を利用した血管内皮前駆細胞治療の経験. 日本アフェレシス学会雑誌 21: 93, 2002
  - 6) Inaba S, Egashira K. Peripheral-blood or bone-marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis? *Lancet* 360: 2083, 2002
  - 7) Inger JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 103: 1231-1236, 1999
  - 8) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzendichler B, Schatteman G, Isner J. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964-967, 1997
  - 9) Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Sasaki-Ki K, Duan J, Imaizumi T. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 103: 897-903, 2001
  - 10) 高倉伸幸: 血液細胞と血管新生. 最新医学 56: 1722-1727, 2001
  - 11) Kawamura A, Horie T, Tsuda I, Ikeda A, Egawa H, Imamura E, Iida J, Sakata H, Tamaki T, Kukita K, Meguro J, Yonekawa M, Kasai M. Prevention of limb ulcers by autologous peripheral blood mononuclear cell implantation. *Ther Apher Dial* 9: 59-63, 2005

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業） 研究報告書

## 難治性血管炎に対する血管再生療法の多施設共同研究 SDF-1/CXCR4システムを利用したより治療効果の高い血管新生療法の開発

分担研究者 高橋 将文

協力研究者 柴 祐司

信州大学大学院医学系研究科

臓器発生制御医学講座 循環器病態学分野

### 【研究要旨】

骨髄細胞を用いてより治療効果の高い血管新生療法を開発するため、骨髄細胞に発現するケモカイン受容体であるCXCR4に着目して検討を行い、培養により骨髄細胞のCXCR4発現が有意に増強すること、このCXCR4発現の増強された培養骨髄細胞は新鮮骨髄細胞と比較してマウス下肢虚血モデルにおける血流改善を有意に促進することを明らかとした。さらに、この血流改善機序として、虚血部位へと移植した骨髄細胞がそこで発現しているSDF-1（CXCR4リガンド）と相互作用してより局所に留まりやすくなることと、CXCR4高発現の骨髄細胞がIL-1 $\beta$ やVEGFなどの血管新生作用を有するサイトカインや増殖因子をより多く産生することを明らかとした。今後、SDF-1/CXCR4システムの役割と血管新生における詳細な機序が解明されることにより、SDF-1/CXCR4システムを標的としたより効果の高い血管新生療法が開発されることが期待される。

### 【はじめに】

近年、幹細胞移植による心血管再生療法が研究・臨床応用されてきている。特に、血管分野における再生医療の発展は著しく、重症虚血に対する骨髄幹細胞を用いた血管再生療法は、現在数多くの施設で行われている。この治療法は、国内の多施設共同研究TACT-1（Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation）によって、その有効性と安全性が報告され、2003年には閉塞性動脈硬化症およびパージャージャー病に対する高度先進医療として保険認可された。骨髄幹細胞移植を用いた血管新生療法では、自己骨髄細胞を使用するため免疫学的および倫理的問題が少ないという利点があるが、全身麻酔下で400-600mLの骨髄液を採取する必要があることから、全身状態の不良な患者や高齢者などではその適応に限界があり、また、再移植における安全性も確立されていない。このような問題点の

克服と、患者さんにより優しい治療法を開発を目的として、これまで我々は、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF: Macrophage Colony-stimulating Factor）に注目して研究を行ってきた。その研究の過程で、血管傷害後の新生内膜形成および心筋梗塞後の血管新生、心室リモデリングにおいて骨髄から動員されるCXC chemokine receptor 4<sup>+</sup>（CXCR4<sup>+</sup>）細胞とそのリガンドであるケモカインStromal cell-derived factor-1（SDF-1: CXCL12）との相互作用、つまりSDF-1/CXCR4システムが重要な役割を果たしていることを見出している。SDF-1は、発生過程における造血幹細胞の骨髄へのホーミングに必須のケモカインであり、生体においても幹細胞を骨髄に留めておく機能を果たしている。一方、その受容体であるCXCR4はAIDSウイルス（HIV-1）の宿主細胞への進入に必要な分子であることが示され、注目されている。心血管系に