

- 骨髓幹細胞移植血管再生治療. *リウマチ科* 35: 276-281, 2006
174. 藤本啓志, 宮本正章, 高木 元: 医療用ウジを用いた多剤耐性緑膿菌(MDRP)合併糖尿病壊疽の治療. *日本糖尿病学会雑誌* 49: 517-521, 2006
175. 水野博司, 赤石論史, 宮本正章: 虚血性難治性皮膚潰瘍に対する骨髓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
176. 宮本正章. 今なぜ医療用ウジ治療 (MDT) か? *Pharma Medica* 24: 61-62, 2006

分担研究者: 藤本和輝

177. 藤本和輝, 宮尾雄治, 古賀英信, 原田恵実, 金澤尚徳: 血管再生療法が非常に有効であった Buerger 病の 1 症例. *Angiology Frontier* 7: 63-67, 2008
178. 宮尾雄治, 田中朋子, 福嶋隆一郎, 原田恵実, 藤本和輝: 心不全例におけるカルベジロール導入クリティカルパスの有用性. *呼吸と循環* 56: 953-956, 2008
179. Kojima S, Funahashi T, Otsuka F, Maruyoshi H, Yamashita T, Kajiwarra I, Shimomura H, Miyao Y, Fujimoto K, Sugiyama S, Sakamoto T, Yoshimura M, Ogawa H. Future adverse cardiac events can be predicted by persistently low plasma adiponectin concentrations in men and marked reductions of adiponectin in women after acute myocardial infarction. *Atherosclerosis* (in press)
180. The Japanese Coronary Artery Disease (JCAD) Study Investigators. Current status of the background of patients with coronary artery disease in Japan. The Japanese Coronary Artery Disease Study (The JCAD Study). *Circ J* 70: 1256-1262, 2006
181. 藤本和輝, 小川久雄. 心筋梗塞治療のメガトリアル. *臨床心臓病学* 207-214, 2006
182. 藤本和輝, 小川久雄. 初期治療は血栓溶解療法か形成術か. *臨床心臓病学* 234-236, 2006

分担研究者: 堀江 卓

183. 米川元樹, 堀江 卓, 津田一郎, 川村明夫. 透析患者の幹細胞治療. *臨床透析* 23: 489-495, 2007

分担研究者: 高橋将文

184. Kobayashi S, Ise H, Takahashi M, Goto M, Akaike T, Ikeda U. Surface coating of bone marrow cells with N-acetylglucosamine for bone marrow implantation therapy. *Biomaterials* 30: 574-582, 2009
185. Shiba Y, Takahashi M, Hata T, Murayama H, Morimoto H, Ise H, Nagasawa T, Ikeda U. Bone marrow CXCR4 induction by cultivation enhances therapeutic angiogenesis. *Cardiovasc Res* 81: 169-177, 2009
186. Koshikawa M, Aizawa K, Kasai H, Izawa A, Tomita T, Kumazaki S, Tsutsui H, Koyama J, Shimodaira S, Takahashi M, Ikeda U. Elevated osteopontin levels in patients with peripheral arterial disease. *Angiology* 60: 42-45, 2009
187. Murayama H, Takahashi M, Takamoto M, Shiba Y, Ise H, Koyama J, Tagawa Y, Iwakura Y, Ikeda U. Deficiency of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in bone marrow cells synergistically inhibits neointimal formation following vascular injury. *Cardiovasc Res* 80: 175-180, 2008
188. Yajima N, Takahashi M, Morimoto H, Shiba Y, Takahashi Y, Masumoto J, Ise H, J Sagara, Nakayama J, Taniguchi S, Ikeda U. Critical role of bone marrow-derived ASC, an inflammasome adaptor molecule, in neointimal formation after vascular injury in mice. *Circulation* 117: 3079-3087, 2008
189. Morimoto H, Hirose M, Takahashi M, Kawaguchi M, Ise H, Kolattukudy PE, Yamada M, Ikeda U. MCP-1 induces cardioprotection against ischemia/reperfusion injury: Role of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res* 78: 554-562, 2008
190. Shiba Y, Takahashi M, Ikeda U. Models for the

- study of angiogenesis. *Curr Pharm Design* 14: 371-377, 2008
191. Kubota K, Soeda J, Misawa R, Mihara M, Miwa S, Ise H, Takahashi M, Miyagawa S. Bone marrow-derived cell fuses with hepatic oval cells but are not involved in hepatic tumorigenesis in the choline-deficient ethionine-supplemented diet rat model. *Carcinogenesis* 29: 448-454, 2008
192. Shiba Y, Takahashi M, Ikeda U. Models for the study of angiogenesis. *Curr Pharm Design* 14: 371-377, 2008
193. Kubota K, Soeda J, Misawa R, Mihara M, Miwa S, Ise H, Takahashi M, Miyagawa S. Bone marrow-derived cell fuses with hepatic oval cells but are not involved in hepatic tumorigenesis in the choline-deficient ethionine-supplemented diet rat model. *Carcinogenesis* 29: 448-454, 2008
194. 高橋将文、石ヶ坪良明、藤本和輝、宮本正章、堀江 卓、相澤義房、天野 純、箕田清次、室原豊明、松原弘明、池田宇一。自己骨髓細胞移植による難治性血管炎に対する血管新生治療。脈管学 (印刷中)
195. 高橋将文。自己免疫性疾患に対する新しいSIPアゴニストの効果。今日の移植 21: 193-199, 2008
196. Shiba Y, Takahashi M, Yoshioka T, Yajima N, Morimoto H, Izawa A, Ise H, Hatake K, Motoyoshi K, Ikeda U. M-CSF accelerates neointimal formation in the early phase after vascular injury in mice: The critical role of the SDF-1-CXCR4 system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 283-289, 2007
197. Hirose S, Takahashi M, Ogawa R, Morimoto H, Izawa A, Sato H, Ise H, Hongo M, Ikeda U. Erythropoietin attenuates the development of experimental autoimmune myocarditis. *Cardiovasc Drug Ther* 21: 17-27, 2007
198. Morimoto H, Takahashi M, Shiba Y, Izawa A, Ise H, Hongo M, Hatake K, Motoyoshi K, Ikeda U. Bone marrow-derived CXCR4+ cells mobilized by M-CSF participate in the prevention of cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction in mice. *Am J Pathol* 171: 755-766, 2007
199. Aso S, Ise H, Takahashi M, Kobayashi S, Morimoto H, Izawa A, Goto M, Ikeda U. Effective uptake of N-acetylglucosamine-conjugated liposome by cardiomyocytes in vitro. *J Control Release* 122: 189-198, 2007
200. Ogawa R, Takahashi M, Hirose S, Morimoto H, Ise H, Murakami T, Yasue T, Kuriyama K, Hongo M, Kobayashi E, Ikeda U. A novel sphingosine-1-phosphate receptor agonist KRP-203 attenuates rat autoimmune myocarditis. *Biochem Biophys Res Commun* 361: 621-628, 2007
201. Ito T, Okada T, Mimuro J, Miyashita H, Uchibori R, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Takahashi M, Ikeda U, Sakata Y, Shimada K, Ozawa K. Adenoassociated virus-mediated prostacyclin synthase expression prevents pulmonary arterial hypertension in rats. *Hypertension* 50: 531-536, 2007
202. Zhao C, Hosoya A, Kurita H, Hu T, Hiraga T, Ninomiya T, Yoshida K, Yoshida N, Takahashi M, Kurashina K, Ozawa H, Nakamura H. Immunohistochemical study of hard tissue formation in the rat pulp cavity after tooth replantation. *Arch Oral Biol* 52: 945-953, 2007
203. Ito T, Okada T, Miyashita H, Nemoto T, Nonaka-Sarukawa M, Uchibori R, Maeda Y, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Takahashi M, Ikeda U, Shimada K, Ozawa K. Interleukin-10 expression mediated by an adeno-associated virus vector prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Circ Res* 101: 734-741, 2007
204. Hirose S, Takahashi M, Ogawa R, Morimoto H, Izawa A, Sato H, Ise H, Hongo M, Ikeda U. Erythropoietin attenuates the development of experimental autoimmune myocarditis. *Cardiovasc Drug Ther* 21: 17-27, 2007
205. Shiba Y, Takahashi M, Yoshioka T, Yajima N,

- Morimoto H, Izawa A, Ise H, Hatake K, Motoyoshi K, Ikeda U. M-CSF accelerates neointimal formation in the early phase after vascular injury in mice: The critical role of the SDF-1-CXCR4 system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 283-289, 2007
206. 高橋将文. 膠原病関連血管炎に対する血管再生療法. *日本血栓止血学会誌* 18: 344-346, 2007
207. 柴 祐司, 高橋将文, 池田宇一. 細胞治療・遺伝子治療. 我が国の虚血性心臓病: 心筋梗塞と狭心症の診療の進歩. *臨床と研究* 84: 67-72, 2007
208. 高橋将文. 細胞移植による心筋再生療法. *信州医学雑誌* 55: 299-300, 2007
209. 高橋将文. 膠原病関連血管炎に対する血管再生療法. *日本血栓止血学会誌* 18: 344-346, 2007
210. Morimoto H, Takahashi M, Izawa A, Ise H, Hongo M, Kolattukudy PK, Ikeda U. Cardiac overexpression of MCP-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Circ Res* 99: 891-899, 2006
211. Fujishiro J, Kudou S, Iwai S, Takahashi M, Hakamata Y, Kinoshita M, Iwanami S, Izawa S, Yasue T, Murakami T, Hashizume K, Kobayashi E. Use of sphingosine-1-phosphate(S1P) 1 receptor agonist, KRP-203, in combination with a subtherapeutic dose of cyclosporine A for rat renal transplantation. *Transplantation* 82: 804-812, 2006
212. Suzuki C, Takahashi M, Morimoto H, Izawa A, Ise H, Hongo M, Hoshikawa Y, Ito T, Miyashita H, Kobayashi E, Shimada K, Ikeda U. Mycophenolate mofetil attenuates pulmonary arterial hypertension in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 349: 781-788, 2006
213. Takahashi M. The role of endothelin-1 in vascular remodeling in vivo. *Cardiovasc Res* 71: 4-5, 2006
214. Fujishiro J, Suzuki C, Kudoh S, Yasue T, Hakamata Y, Takahashi M, Murakami T, Hashizume K, Kobayashi E. Conversion from cyclosporine A to mycophenolic acid with a sphingosine-1-phosphate receptor antagonist, KRP-203, reverses host nephrotoxicity and prevents transplant arteriosclerosis. *J Heart Lung Transpl* 25: 825-833, 2006
215. Kaneko T, Murakami T, Kawana H, Takahashi M, Yasue T, Kobayashi E. Sphingosine-1-phosphate receptor agonists suppress concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 345: 85-92, 2006
216. Misawa R, Ise H, Takahashi M, Morimoto H, Kobayashi E, Miyagawa S, Ikeda U. Development of liver regenerative therapy using glycoside-modified bone marrow cells. *Biochem Biophys Res Commun* 342: 432-440, 2006
217. Sato H, Takahashi M, Ise H, Yamada A, Hirose S, Tagawa Y, Morimoto H, Izawa A, Ikeda U. Collagen synthesis is required for ascorbic acid-enhanced differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 342: 107-112, 2006
218. Suzuki C, Takahashi M, Morimoto H, Izawa A, Ise H, Fujishiro J, Murakami T, Ishiyama J, Nakada A, Nakayama J, Shimada K, Ikeda U, Kobayashi E. Efficacy of Mycophenolic Acid Combined With KRP-203, a Novel Immunomodulator, in a Rat Heart Transplantation Model. *J Heart Lung Transpl* 25: 302-309, 2006
219. Yoshioka T, Takahashi M, Shiba Y, Suzuki C, Morimoto H, Izawa A, Ise H, Ikeda U. G-CSF Accelerates Reendothelialization and Reduces Neointimal Formation After Vascular Injury in Mice. *Cardiovasc Res* 70: 61-69, 2006
220. Okada T, Uchibori R, Iwata-Okada M, Takahashi M, Nomoto T, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Liu Y, Mizukami H, Kume A, Kobayashi E, Ozawa K. A histone deacetylase inhibitor enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in tumor cells. *Mol*

Ther 13: 738-746, 2006

221. Jia L, Takahashi M, Morimoto H, Takahashi S, Izawa A, Ise H, Iwasaki T, Hattori H, Ikeda U. Changes in cardiac lipid metabolism during sepsis: the essential role of very low-density lipoprotein receptors. *Cardiovasc Res* 69: 545-555, 2006
222. Jia L, Takahashi M, Yoshioka T, Morimoto H, Ise H, Ikeda U. Therapeutic potential of endothelial progenitor cells for cardiovascular diseases. *Current Vascular Pharmacology* 4: 59-65, 2006
223. 高橋将文. 骨髓細胞による血管新生・血管再生. *日本血栓止血学会誌* 17: 715-718, 2006

知的所有権の取得状況

- 特許公開 2002-171965 骨髓単核球細胞の分離、濃縮方法及び血管再生剤
- 特許公開 2003-250820 血管の再生方法、そのための細胞の分離回収方法及び装置
- 特許公開 2006-028085 血中コレステロール低下作用物質
- 特許公開 2006-115771 骨格筋由来の心筋幹細胞
- 特許出願 2005-183614 N-アセチルグルコサミン糖鎖認識タンパク質
- 特許照会番号 OTA02-111 心臓由来の心筋前駆細胞

分担研究報告書

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

分担研究者 松原弘明

研究協力者 的場聖明

京都府立医科大学大学院医学研究科 循環器内科学

研究要旨

膠原病は、全身性炎症性疾患であるが、しばしば血管の炎症に伴う臓器障害を来す。その中でも四肢虚血による疼痛、潰瘍、壊疽は、患者の苦痛の第一位に上げられ、QOLの低下も余儀なくされる。ステロイド薬や免疫抑制剤以外に交感神経節ブロックや血管拡張薬の投与も試みられているが、治療が奏功しない場合が多く、四肢の切断を余儀なくされる。

我々は、閉塞性動脈硬化症やバージャー病に対する骨髄単核球を利用した血管再生医療の安全性と有効性を世界に先駆けて報告し、国内でも保険適応を可能にし、現在骨髄単核球と末梢血単核球を用いて治療を続けている。

膠原病は、それぞれの疾患の病態、病期、内服治療により、血管炎の病態、進行に違いがあるため、個々の症例について詳しく検討する必要があるが、これまでの膠原病による重症虚血下肢に対する血管新生治療の効果を5例7肢に施行し、いずれも症状の改善を認め、major amputationは、1肢も認めていない。閉塞性動脈硬化症やバージャー病においてこれまで認められた背景や採取細胞数と比較し、血管再生医療の効果、安全性を報告する。

緒言

骨髄単核球を利用した血管再生治療は閉塞性動脈硬化症やバージャー病への先進医療が認められ、日本国内での施行施設が増加し、その安全性や有効性から世界中に拡大しつつある。

バージャー病の病因も血管炎に基づくものであり、血管再生医療の著明な効果を膠原病による血管炎の患者に試みることは、四肢の難治性潰瘍や疼痛を患っている患者に朗報をもたらす可能性が高い。長期経過を観察できた結節性動脈周囲炎患者、アレルギー性肉芽腫性血管炎と混合性結合組織病の3例を含め5症例7肢について報告する。

方法

私達が行っている重症虚血下肢への血管新生療法の適応基準を示す。

- 1) 末梢性血管疾患：Fontaine分類III度およびIV度（ABI<0.6を目安）、安静時痛または虚血性潰瘍・壊死を有する患者で、内科的・外科的に血行再建術の適応が無く、将来切断が予想される患者。
- 2) 性別：男性および女性（妊娠中および妊娠の可能性のある女性を除く）
- 3) 年齢：原則として20歳以上80歳以下
- 4) 適応除外事項：過去3ヶ月以内にアルコールもしくは薬物依存の既往のある患者、悪性

新生物を有する患者及び3年以内にその既往のある患者、別途規定の諸検査により悪性腫瘍の可能性があると判断された患者、未治療の糖尿病性網膜症を有する患者、インフォームドコンセントを得られない患者、その他、主治医が不相当と判断した患者。

膠原病と診断された症例で、上記の基準を満

たした患者に対し、自己骨髄単核球または、自己末梢血単核球細胞を用いて血管新生治療を行った(表1)。手技はこれまでの我々の報告(1)と同様で、術前術後のfollow upとして、死亡率、下肢切断を主要評価項目とし、検査として潰瘍径、安静時痛、歩行距離、ankle-brachial index (ABI)、tissue oxygen concentration (TcO₂)、skin perfusion pressure (SPP)を検討した。

表1

膠原病に基づく重症虚血下肢に対する血管再生医療(5例7肢)

病名	年齢	性	Fontaine	施行日
PN	68	F	IV	右下肢切断後 左下肢2006/11
AGA	49	M	IV	左下肢2007/6 右下肢2007/12
MCTD	45	F	IV	右下肢2007/11
SLE	51	F	III	左下肢2008/9 右下肢2008/11
PSS	65	F	IV	左下肢2008/10

結果

術後1年以上経過した3症例と他2症例に対する効果を示す。

E.L氏 68歳 女性 病状経過

- #1 重症虚血下肢：左足趾の黒色化、左外果潰瘍の拡大
- #2 (皮膚型)結節性動脈周囲炎、右下腿切断後
- #3 右鎖骨下動脈狭窄
- #4 糖尿病 #5 高脂血症 #6 高血圧症

皮膚型結節性多発動脈周囲炎に対して副腎皮質ステロイド(プレドニゾロン 5 mg/day)にて治療中。2003年には右下腿壊疽にて右下腿は切断されている。2006年10月より安静時疼痛(VAS 5-7/10)と左外果(径1.5×1.5 cm)および左第1趾尖の皮膚潰瘍が出現し、血管造影では左前脛骨・後脛骨・腓骨動脈の途絶が認めら

れた。10月20日より当科に入院し、内服薬に加えてプロスタグランジン製剤の点滴静注を行ったが改善せず、ABIは1.05だが foot-dorsal レベルでのskin perfusion pressure (SPP)は11 mmHgと低値であり、難治性血管炎(結節性動脈周囲炎)による重症虚血下肢と診断した。

同年11月28日に当科で骨髄単核球細胞移植による血管新生治療を施行した。移植細胞数は 3.08×10^9 (CD34⁺細胞 2.77×10^7)個で左下肢へ約120箇所に移植した。血管再生医療後、局所の熱感はなかったが、左足趾の黒色化、左外果潰瘍の拡大、疼痛が持続し(VAS 7/10)、引き続き皮膚科での消毒・局所治療を継続した。歩行リハビリテーションにより最終的には60 mまで歩行可能となった。疼痛に対しては、レバタン坐薬を1日4回使用することで自制内となり、再生医療後、感染を示唆する徴候は認められなかった。

血管再生医療約2ヶ月後では、重症虚血下肢の改善はまだ認められず、左足趾の黒色化(趾球レベルまで)、左足底半分の黒色化、左外果から足背への潰瘍の拡大、左踵部への潰瘍進行(径2×8 cm、径2×10 cm)と疼痛が持続していた。左内果面は比較的保たれていた。3ヶ月後の2007年2月15日に皮膚科にて左足趾切断と足背と足底潰瘍のデブリードマンを行った。疼痛(VAS 7/10)は、6ヶ月後、12ヶ月後も持続し、鎮痛薬を継続しているが、下肢の major

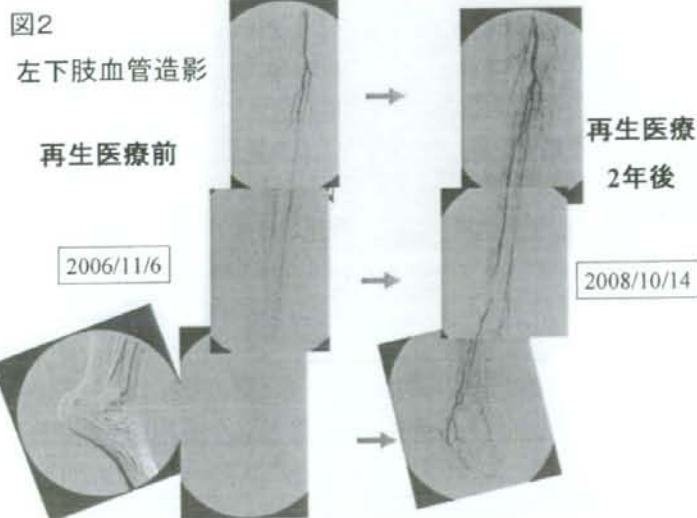
amputation は回避され、自宅での家事なども行えるようになった(図1)。

しかしながら、2年経過後も下肢痛(VAS 7/10)が持続するため、再度血管撮影を施行した(図2)。

DSAにて血管の増生を著明に認めたため、残存する下肢痛は神経障害によるものと考えられた。

血流改善により下肢切断を免れ、下肢痛は軽快したが、消失には至らなかった。

図1 F.I.氏68歳女性の臨床経過(PN)



結節性動脈周囲炎に対する血管再生医療後の1症例である。全身の炎症反応は落ち着いていたが、骨髄単核球細胞移植後に局所の炎症が一時的に惹起された。しかし、領域は移植前に認めた炎症領域の範囲内であり、むしろ血流増大のため、炎症修復が早くその後の皮膚移植の生着を促進したと考えられた。皮膚科との緊密な連携治療にて、血管新生治療の効果が最大限に発揮された1例である。

M.N.氏 49歳 男性 病状経過

#1 重症虚血下肢：左足趾の壊疽、左足趾潰瘍の拡大

#2 アレルギー性肉芽腫性血管炎

#3 好酸球増多症

主訴；左足趾潰瘍の悪化、壊疽の進展

既往歴；特になし。

現病歴；2006年3月感冒症状を契機に前医にて、好酸球増多症と診断され、副腎皮質ステロイド内服中。10月より左下肢冷感と間欠性跛行が出現・進行し、下肢 CT アンギオグラフィーにて

両下腿の三分枝は、閉塞または途絶しており、インターベンションの適応なしと判断され、再生医療目的にて紹介となり、5月28日に入院となる。2007年4月より安静時疼痛 (VAS 8/10) と左第3趾の壊疽および左第2趾尖の皮膚潰瘍が出現し持続していた。内服薬に加えてプロスタグランジン製剤の点滴を行ったが改善せず、ABIは0.58であり、foot-dorsalレベルでのskin perfusion pressure (SPP)は5 mmHgと低値であり、難治性血管炎 (アレルギー性肉芽腫性血管炎) による重症虚血下肢と診断した。下肢血管造影にて左前脛骨・後脛骨の途絶・腓骨動脈の閉塞が認められ、左下肢に対する血管再生医療を行う事となった (図3)。

6月13日に両脛骨より骨髄単核球 2.9×10^9 個 (CD34陽性細胞 2.03×10^7 個)を、既報の如く濃縮し、左下肢に筋肉注射を行った。足趾潰瘍の拡大は止まり、左下肢の冷感の改善と、脈波の出現を認め、ABI (0.58→0.73)、SPP (5→64 mmHg)も改善している (図4)。6ヶ月後、足趾 (I-IV趾)のminor amputation 及び皮膚移植を行い、疼痛も



図3
M.N.氏血管造影(07/05/29)

血管造影では左前脛骨・後脛骨の途絶・腓骨動脈の閉塞が認められた。

全く認めなくなった。6ヶ月後、の下肢血管造影にても左下腿血流の著明な増加を認め (図5)、本例における骨髄単核球細胞による血管再生治

療は、著明に効果があることが証明された。

内服しているプレドニゾロンは、移植当初 30 mg/dayであったが、好酸球の増加を認めていな

いことから、6ヶ月後には15 mg/dayに減量できた。疼痛が消失し、歩行リハビリテーションにより制限無く歩行可能となった。当初使用していた1日4回のレベタン坐薬も、使用せず、社会

復帰された。また、同年11月からみられた右I趾潰瘍に対して再び骨髓単核球細胞を12月25日に移植し3ヶ月後に、潰瘍の消失をみた(図6)。

図4 M.N.氏 49歳男性の臨床経過 (AGA)



図5

左下肢血管造影

再生医療前

↓

再生医療

6ヵ月後



図6 右下肢難治性潰瘍に対する再生医療



本症例では、移植前に骨髓細胞標本にて好酸球が増加していない事を確認している。移植前に内服薬以外に血管拡張剤の長期点滴などを試みられていたが、効果が無く当院に紹介となった患者である。移植後に局所における一時的な炎症反応がみられたが、移植直後から皮膚温の上昇や潰瘍部における出血などがみられ、ABIやskin perfusion pressure (SPP)も上昇した。好酸球増多症のためプレドニゾロンを15-30 mg/day使用しているが、骨髓単核球細胞移植による血管新生の効果を著明に認めた

Y.H.氏 43歳 女性 病状経過

#1 重症虚血下肢：右II趾の壊疽、

#2 混合性結合組織病 (MCTD)

主訴；右足趾壊疽の進展、安静時痛
既往歴；特になし。

現病歴；2002年12月から右手指潰瘍、股関節痛、歯肉出血を認め、多発性筋炎の診断のもと治療を開始され、その後に混合性結合組織病と診断されるも改善せず。2007年7月から右II趾の潰瘍のため当院膠原病科に紹介され、血管拡張剤を投与されるも効果なく右II趾は壊疽に陥ったが、安静時痛も続いており、再生医療目的にて紹介となる。

2007年10月31日に入院となり11月27日に再生医療を施行した。再生医療 6日後に右II趾を皮膚科にて切断した。右II趾の潰瘍は、その後軽

快し、下肢痛も軽快、消失した (図7,8)。

本症例では、移植後に趾切断を行ったが、潰瘍は悪化することなく軽快した。プレドニゾロンは12.5 mg/day 継続内服中であるが、骨髓単核球細胞移植による血管新生の効果を認めた。

他2症例の経過

臨床経過が、1年未満の他の2症例を含めて5症例7肢の採取細胞数、CD34陽性細胞数及び臨床経過を表2に示す。

SLE 症例は、症状は安静時痛のみで、潰瘍、壊疽を認めず両足に症状を認めたことから、末梢血単核球による血管新生治療を行ったが、いずれも安静時痛の改善のみでなく、足趾の運動能力改善をみとめており、今後も経過観察の予定である。

また強皮症 (PSS) の1例も潰瘍の縮小、安静時痛の軽快、歩行距離の大幅改善を認めており、再生医療の効果を著明に認めたと考えられる。

閉塞性動脈硬化症 (PAD)、バージャー病における骨髓単核球細胞移植の効果との比較

私達は多施設共同研究において閉塞性動脈硬化症 (PAD)、バージャー病における骨髓単核球細胞移植の長期効果を検討した。バージャー病の方が閉塞性動脈硬化症 (PAD) の患者に比べて予後良好であったが、我々の経験した膠原

図7

Y.H.氏45歳女性の臨床経過
(MCTD)



図8

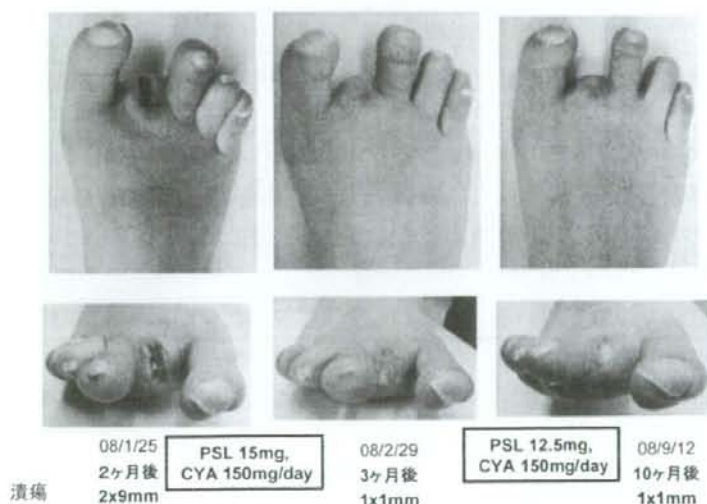


表2
膠原病全症例の採取細胞数
及び経過

	Disease	symptom	Age SEX	Total Cell Number (x10 ⁹)(SD)	CD34 ⁺ Number (x10 ⁷)(SD)	Outcome	
2006	PN	Ulcer Gangrene	68 F	3.08	2.77	Improvement in VAS, walking time, ulcer size Improvement in ABI, TcO ₂ , AOG	2years
2006	AGA (Lt)	Ulcer Gangrene	49M	2.9	2.03	Remarkable improvement in VAS, walking time, ulcer size Improvement in ABI, TcO ₂ , AOG	1.5years
2006	AGA (Rt)	Ulcer	49M	2.46	2.24	Remarkable improvement in VAS, walking time, ulcer size Improvement in ABI, TcO ₂	1year
2007	MCTD	Ulcer Gangrene	45F	2.2	2.9	Remarkable improvement in VAS, walking time, ulcer size No improvement in ABI, TcO ₂	1year
2008	SLE (Lt)	Rest pain	51F	6.65*	0.18*	Remarkable improvement in VAS, walking time	3M
2008	SLE (Rt)	Rest pain	51F	4.8*	0.10*	Remarkable improvement in VAS, walking time	1M
2008	PSS	Ulcer Gangrene	65F	1.76	1.82	Remarkable improvement in VAS, walking time, ulcer size Improvement in ABI, TcO ₂	1M

*本症例のみ末梢血単核球細胞を使用

病による重症虚血下肢においてもバジャー病と同等またはそれ以上の効果を認めている。表3に骨髓細胞移植を用いた4例5肢と多施設共同研究における細胞数を示す。同じ方法で採取しているにも関わらず、回収した骨髓単核球細胞数及びCD34陽性細胞数は、やや少ない傾向

にあった。これら4症例は、術前術後とも全例でステロイド内服を継続している。経過が短いので単純に比較できないが、膠原病による重症虚血下肢において骨髓単核球細胞移植は、安全かつ効果的であった。

表3 PAD, TAOに対する骨髓単核球細胞移植治療との比較

Year	Source	Pts	No. of Pts	Total Cell Number (x10 ⁶)(SD)	CD34+ Number (x10 ⁷)(SD)	Outcome	Follow-up period
2008	Matoba et al. Am Heart J 2008;156:1010	CLI PAD TAO	Total 115 (74) (41)	3.1(2.8) 4.1(3.6)	2.6(2.3) 4.6(4.0)	Significant improvement in VAS, walking time, ulcer size No improvement in ABI, TcO ₂	3 years
	Disease		Age				
			SEX				
2006	PN	Ulcer Gangrene	68 F	3.08	2.77	Improvement in VAS, walking time, ulcer size Improvement in ABI, TcO ₂ ; AOG	2 years
2006	AGA (Lt)	Ulcer Gangrene	49M	2.9	2.03	Remarkable improvement in VAS, walking time, ulcer size Improvement in ABI, TcO ₂ ; AOG	1.5 years
2006	AGA (Rt)	Ulcer	49M	2.46	2.24	Remarkable improvement in VAS, walking time, ulcer size Improvement in ABI, TcO ₂	1 year
2007	MCTD	Ulcer Gangrene	45F	2.2	2.9	Remarkable improvement in VAS, walking time, ulcer size No improvement in ABI, TcO ₂	1 year
2008	PSS	Ulcer Gangrene	65F	1.76	1.82	Remarkable improvement in VAS, walking time, ulcer size Improvement in ABI, TcO ₂	1M
Mean (BMMNC)				2.46(0.53)	2.36(0.57)		1M-3Yrs

考 察

難治性血管炎に対する血管再生医療後の5症例7肢を示した。膠原病に対する骨髓単核球細胞移植の効果は、これまでに報告された閉塞性動脈硬化症やバジャー病ほど明らかではない。血管障害や閉塞の機序も膠原病では違いがあると考えられ、血管内皮前駆細胞の数や機能についても不明なことが多い。しかし、これらの5症例のように合併症なく著明に効果がみられ、6-24ヶ月後の有効性、安全性も示された。これまでに、これら5症例以外に膠原病に伴う重症虚血下肢の患者が他3名当科に紹介になったが、2名は経済的理由により施行できず、外来にて経過観察中である。今後症例数の増加と多施設共同研究による長期効果を検討する必要があるが、本治療の適応を膠原病患者への拡大を検討する必要があると考えられた。

結 語

膠原病による重症虚血下肢において骨髓単核

球細胞移植は、安全かつ効果的であった。

文 献

1. 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 ischemia by autologous transplantation of bone marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 360: 427-435, 2002.
2. Matoba S, Tatsumi T, Murohara T, Imaizumi T, Katsuda Y, Ito M, Saito Y, Uemura S, Suzuki H, Fukumoto S, Yamamoto Y, Onodera R, Teramukai S, Fukushima M, Matsubara H, TACT Follow-Up Study Investigators. Long-term clinical outcome after intramuscular implantation of bone marrow mononuclear cells (TACT Trial) in patients with chronic limb ischemia. *Am Heart J* 156:1010-1018, 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

難治性血管炎に対する血管再生医療

分担研究者 室原豊明
名古屋大学大学院医学系研究科
病態内科学講座 循環器内科学分野

研究要旨

EPCsを用いた血管新生療法は、自己骨髄移植による重症虚血肢に対する血管新生療法（TACT trial）によりその有用性が証明され、現在臨床応用の段階にあるが、糖尿病、透析患者、閉塞性動脈硬化症などの患者の中には、十分な治療効果が期待できない症例が含まれていることも明らかになった。Zukらは脂肪組織から間葉系幹細胞に類似した細胞集団の存在を報告し、その細胞集団は脂肪組織由来幹細胞（ADRCs）と呼ばれ、多系統への分化能を有している。そこで我々はこのADRCsの血管新生効果に着目、新しい血管新生療法のソースとして利用できるかどうか検討した。マウス皮下脂肪組織を抽出し、培養したADRCsを下肢虚血組織に筋注移植し、移植後の血管新生効果を検討した。結果、ADRCs移植により下肢虚血モデル作製後の血管新生効果は増強した。また、ADRCs移植に伴う血管新生増強効果の機序として、SDF-1（間質細胞から分泌されるCXCケモカインサブファミリーの1つ）を介した骨髄からのEPCの動員が考えられた。そこで脂肪組織由来幹細胞は、次世代血管新生療法の新しい細胞供給源となりうる可能性が示唆された。自己脂肪組織由来幹細胞を用いた上記治療法は、現在、名古屋大学倫理委員会の承認を得て、臨床試験施行予定にある。

背景

閉塞性末梢動脈疾患（閉塞性動脈硬化症・パージャール病・膠原病に伴う難治性血管炎）の患者は、間欠性跛行・安静時疼痛・皮膚潰瘍・壊死などの症状を呈し、quality of life (QOL)が著しく低下するだけでなく、四肢切断に至るケースも多い。治療法としては、生活習慣の改善、運動療法（軽症の場合）、薬物療法、カテーテルによる血管拡張術やバイパス術などの血行再建術が行われてきたが、動脈硬化病変が重症でありまた病変が末梢にあるなどのためにこれら従来の治療法が無効あるいは不可能な症例も少なくない。特にパージャール病や膠原病に伴う難治性血管炎患者では、通常病変は末梢にあり、外科的治療や血管内治療の適応になりにくい。

このような症例に対して最近、虚血周囲の比較的健全な組織からの血管新生や側副血行の発達を人為的に促進し、虚血組織の修復・壊死を軽減させようとする試みがなされている。これらの一連の戦略は治療的血管新生（therapeutic angiogenesis）と呼ばれ、組織の虚血を改善するのみならず、機能を回復させる観点からも大変重要である。

血管新生治療

現在虚血組織に対する血管新生療法としては、大きく2種類存在している。すなわち1) 血管新生因子の蛋白や遺伝子治療を虚血部位あるいは静脈投与して血管新生を促す方法（血管増殖因子を用いた治療）と、2) 骨髄あるいは

末梢血中に存在している幹細胞や前駆細胞を用いた細胞治療である。1994年米国タフツ大学の Isnerらが血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor) を用いた臨床応用が開始し治療的血管新生 (therapeutic angiogenesis) という概念を提唱して以来、虚血組織に対する血管新生治療の研究・開発が急速に進展しはじめた。最近では大阪大学の森下らが、HGF(Hepatocyte Growth Factor)を用いた血管再生療法の臨床研究を行っている。

さらに、成体において末梢血中に血管内皮細胞のもととなる血管内皮前駆細胞が CD34 陽性細胞分画に多く存在すること、またこれらの細胞が骨髄細胞由来であることが報告されて以来、血管内皮前駆細胞あるいは前駆細胞を多く含む骨髄単核球細胞を用いて血管新生治療が行えることを我々は明らかにし、2000年より世界に先駆けて骨髄単核球細胞移植による重症下肢虚血治療 (Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation: TACT) が有効であることを報告してきた。その後、骨髄単核球細胞移植による治療は、現在高度先進医療として特定の認定施設では保険適応治療として行えるようになってきている。

末梢血中や骨髄細胞中に存在している血管内皮前駆細胞は、もともと自己の細胞であり、安全性や特許などの問題点が少ない。更に、我々はラットやウサギを用いた動物実験を繰り返し、骨髄単核球細胞移植が虚血部位の血管新生を促進し組織の虚血を改善することを確認してきた。そこで、自己骨髄単核球細胞移植は、従来の方法では血行再建不可能な重症下肢虚血の虚血を改善し機能の回復が期待できると判断し、倫理委員会に申請・承認後、2000年より継続して自己骨髄単核球細胞移植による末梢閉塞性動脈疾患患者の血管新生療法に関する多施設臨床試験 (TACT Study Group) を行っている。

本治療では、骨髄単核球細胞中に含まれる血管内皮前駆細胞 (CD34陽性細胞など) の移植の効果のみならず移植される細胞からは VEGF や bFGF などの血管増殖因子が分泌される。つまり、血管の基盤となる前駆細胞の移植に加え

て、血管新生因子も大量に虚血部位で放出されるため、両方の作用の相乗効果が得られることとなる。

また最近我々は、自己骨髄単核球細胞移植以外の方法として自己脂肪組織由来間葉系幹細胞 (Adipose-derived regenerative cell: ADRC) 移植による血管再生療法も基礎的な検討を行っている。この治療法は自己細胞で免疫拒絶反応がなく、また、閉鎖系の器機で細胞が分離できるため、早期の臨床応用が可能であると考えている。

自己脂肪組織由来間葉系幹細胞 (Adipose-derived regenerative cell: ADRC) 移植による血管再生療法

脂肪組織は我々人間の体重の約10%以上を占める臓器である。2001年 Zuk, Hedrick らはこの脂肪組織から間葉系幹細胞に類似した細胞集団の存在を証明した。その細胞集団は Adipose-derived stem cells (ASCs)、あるいは Adipose-derived regenerative cell (ADRC) と呼ばれ、間葉系多系統細胞への分化能を有していると考えられ、分化誘導培地で培養すれば2-3週間で骨、軟骨、脂肪などに分化誘導可能で、更に in vivo において心筋、神経、腱へ分化誘導できるという可能性も示された。そこで我々はこの ADRCs の血管新生効果に着目し、新しい血管新生療法の細胞ソースとして利用できるかどうかを検討した。

<目的>

まず我々は ADRCs を用いた血管新生療法の治療効果を検討、さらに、治療効果が認められた場合は、その治療効果増強の機序につき検討することにした。血管新生評価モデルとしてマウス下肢虚血モデルを作製した。そけい部より皮下脂肪組織を抽出、培養したADRCsを下肢虚血骨格筋組織に移植し、移植後の血管新生効果を検討した。

ADRCsの培養に関しては、マウスより皮下脂肪組織を摘出し、コラゲナーゼ処理をした後、フィルターでろ過し、遠心沈殿した細胞 (Stromal Vascular Fraction: SVFs) を培養した。培養一日目には線維芽細胞様の接着細胞を認め、

1週間で約10倍に増殖した。培養したADRCsは免疫染色にて大部分が間葉系マーカーでの1つである α SMA陽性を示した。またADRCsを分化誘導すると、成熟脂肪細胞への分化を認めた。脂肪滴の貯留といった形態的特長をOil-red O染色にて確認した。培養したADRCsをフローサイトメトリーにより解析を行ったところ、表面抗原はSca-1陽性、Lin陰性と未分化細胞と考えられる特徴を示した。しかしながら、内皮前駆細胞に認められるようなCD31, c-kit, flk-1などの内皮系表面抗原は認められなかった。

このADRCsを下肢虚血領域に移植したところ、レーザードップラー法による解析にて、コントロールと比較しADRCs移植群は、1週目より有意な血流改善を示し、その効果は3週まで持続した。一方、成熟脂肪細胞(Mature adipocyte: MAs)を移植しても血管新生改善効果は認めなかった。同様に、虚血組織中の毛細血管密度をCD31による免疫染色法により検討したが、ADRCs移植群はMA群、control群と比較し、有意なCapillary densityの増加を示した。

次にADRCs移植に伴う血管新生増強効果の機序を検討した。我々はASCs移植の治療効果とEPCとの関係に注目、特に血管新生増強効果に強く関係しているといわれているEPC動員への関与を検討した。そこで、骨髄及び末梢血の単核球培養法を行い、骨髄および末梢血中のEPC数の定量評価をおこなった。骨髄中では虚血作製3日後にコントロール群と比較しADRCs移植群では有意な増加を示した。また、末梢血でも3日後・7日後において、コントロール群と比較し流血中EPCの有意な増加を示した。さらに、Sca-1陽性/flk-1陽性単核球をEPCと定義し、フローサイトメトリーによるEPCの解析を行ったところ、骨髄及び末梢血中の単核球のEPC数は同様に、骨髄中で3日後、末梢血中で7日後にコントロールと比較し有意な増加を認めた。

以上の結果より、マウス下肢虚血モデルにおけるADRCs移植は、骨髄から末梢血中へのEPC動員を増加させ、血管新生を増強することが確認された。そこで、我々はその機序のひと

つとして間質細胞から分泌されるCXCケモカインサブファミリーに属するSDF-1と血管新生増強作用を有するサイトカインの1つであるVEGFに注目した。

まず、*in vitro*における予備実験を行ったところ、培養成熟脂肪細胞(MAs)に比べてADRCsでは個々の細胞より得られたmRNAレベルにおいてSDF-1が多く発現しており、これらの培養液中においてもSDF-1蛋白濃度は高値を示していた。VEGF蛋白に関しては両群に差を認めなかった。

そこで*in vivo*虚血組織においてADRCs移植に伴い血管新生促進因子であるSDF-1およびVEGFの放出が増強するか否かを検討した。ADRCs移植によりSDF-1は下肢虚血作成後3日目に、VEGFは3日および7日目にmRNAの発現が増強していた。また、同様に血中濃度をELISA法にて測定したところ、術後3日目にSDF-1、VEGFともにコントロール群と比較し有意に増加していた。

次に、移植後のADRCsが*in vivo*においてどのような役割をしているかを確認するために、GFPトランスジェニックマウス由来のADRCsを下肢虚血作成後に移植し、免疫染色法にて評価した。抗SDF-1抗体による免疫染色にて下肢虚血3日後にはADRCsは筋線維周囲に存在し、その一部はSDF-1を分泌していることが確認された。また、ADRCsからのVEGFの直接の分泌は確認されなかったが、ADRCsの周囲の筋線維にVEGFが発現している事が確認された。

また、虚血作成28日後にADRCsの内皮細胞への分化を評価するために、CD31による蛍光免疫染色を行ったところ、ADRCsは血管構造周囲または、毛細血管周囲に存在していることは確認されたが、内皮細胞への直接の分化は確認できなかった。しかし、内皮細胞マーカーであるCD140bは陽性を示した。

以上より我々は、ADRCs移植による血管新生増強効果には、ケモカインSDF-1が重要な役割を果たしていると考え、これらを確認するため下肢虚血モデルへのADRCs移植後にSDF-1中和抗体の腹腔内投与を行い、その血管新生効

果および EPCs 動員への影響につき検討した。その結果、SDF-1 中和抗体投与群では ADRCs 移植に伴う血管新生増強効果は解除され、培養法、FACS 解析いずれにおいても虚血作成 7 日後の流血中 EPCs の減少を認めた。

以上より、ADRCs 表面抗原には EPC に認められるような内皮特異的な抗原は認められなかった。にもかかわらず、ADRCs 移植により血管新生効果は増強した。ADRCs 移植に伴う血管新生増強効果の機序として、SDF-1 を介した骨髄からの EPC 動員が考えられた。虚血部位への自己脂肪組織由来幹細胞移植は、次世代血管新生療法の新しい細胞供給源となりうる可能性が示唆された。

当施設における治療実績

現在自己骨髄単核球細胞移植による血管再生療法を継続している。現在骨髄細胞移植による TACT 治療者は、通算11例である。また、上記の新しい自己脂肪組織由来幹細胞移植は、厚生労働省ヒト幹細胞治療指針への申請準備中であり、早ければ今年内に臨床研究をスタートする。

文 献

1. Matoba S, Tatsumi T, Murohara T, Imaizumi T, Katsuda Y, Ito M, Saito Y, Uemura S, Suzuki H, Fukumoto S, Yamamoto Y, Onodera R, Teramukai S, Fukushima M, Matsubara H; TACT Follow-up Study Investigators. Long-term clinical outcome after intramuscular implantation of bone marrow mononuclear cells (Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation [TACT] trial) in patients with chronic limb ischemia. *Am Heart J*. 2008; 156: 1010-1018.
2. Kitamura T, Asai N, Enomoto A, Maeda K, Kato T, Ishida M, Jiang P, Watanabe T, Usukura J, Kondo T, Costantini F, Murohara T, Takahashi M. Regulation of VEGF-mediated angiogenesis by the Akt/PKB substrate Girdin. *Nat. Cell Biol*. 2008; 10: 329-337.
3. Kondo K, Shintani S, Shibata R, Murakami H, Murakami R, Imaizumi T, Kitagawa S, Murohara

T. Implantation of adipose-derived regenerative cells enhances ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2009; 29: 61-66.

4. Kondo M, Shibata R, Miura R, Shimano M, Kondo K, Li P, Ohashi T, Kihara S, Maeda N, Walsh K, Ouchi N, Murohara T. Caloric restriction stimulates revascularization in response to ischemia via adiponectin-mediated activation of eNOS. *J. Biol. Chem*. 2009; 284: 1718-1724.

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

膠原病に伴う末梢血管疾患に対する自己末梢血単核細胞分画の
繰り返し移植による血管再生療法

分担研究者 箕田清次

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

研究要旨

【目的】

膠原病では、レイノー現象や血管炎などにより指趾の血流障害をきたすことが多い。血流障害をきたした指趾では、疼痛や冷感、さらには潰瘍を生じやすく重症例では壊疽に至ることもある。以前の研究成果から、骨髓単核球も末梢血単核球も同等の効果を示したこと、また有効性を示す期間が比較的短かった事実をふまえ、我々は膠原病に伴う血流障害を有する5症例の指趾に対し、自己末梢血単核細胞分画の繰り返し移植を行い、その有効性および安全性について評価を行った。

【方法】

自己末梢血を400～1600 ml採取し、比重遠心分離法を用いて単核細胞分画を分離した。なお、単核細胞分画を採取した後の血液は、速やかに患者に返血した。分離した単核細胞分画は、RPMI 培地に懸濁して8 ml～16 mlに調整し、0.2～0.4 mlずつ20～80カ所手掌および/または足底の骨格筋ないし骨膜下へ注入した。この移植術を、3ヶ月ごとに1年間、計4回繰り返して行った。

【結果】

疼痛、冷感、満足度に関するvisual analog scaleは、全ての症例で1年後に治療前と比較して改善がみられた。サーモグラフィーにより測定した皮膚表面温度は、5例中2例で上昇傾向が見られた。ankle brachial pressure indexは、足趾に深掘れ潰瘍が形成されていた症例4で治療前低下していたが、1回目の移植後に正常化した。外観の評価では、治療前5例中4例の指趾に潰瘍がみられていたが、1年後には全例の潰瘍が治癒した。angiographyは、治療前と比較して2例で1年後に移植部位の描出血管が増加した。

【考察】

末梢血単核細胞分画の繰り返し移植により、膠原病に伴う血流障害に起因する指尖潰瘍の改善効果、血流改善効果、疼痛改善効果があることが確認された。これらの効果は、移植後数週間で見られ始めたことから、移植後早期にみられる効果は血管拡張因子による血管拡張作用が主体であると考えられた。また、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、短期間での繰り返し移植が可能であり、難治性病変、再発性病変に対しても対応することができ、再発が多い膠原病に伴う末梢血管障害に対しては、特に適した方法であると考えられた。これまで3年間の経過観察を行っているが、軽微なものを含め副作用は見られておらず、安全性の高い治療方法であると考えられた。

緒言

膠原病では指趾の冷感やレイノー現象がみられることが多い。レイノー現象を認める指趾においては、光学顕微鏡では、毛細血管の内皮細胞腫大に伴う血管内腔の狭小化が観察される。この腫大した内皮細胞は、電子顕微鏡では細胞質内にフィラメントやWeibel-Palade bodyの増生と様々な基底膜の変化が観察される⁽¹⁾。このような血管の器質的变化により血流障害が生じている指趾に、寒冷刺激が加わると血管が攣縮し阻血の悪循環が惹起される。また、血管障害を有する指趾では、血流障害に伴う潰瘍を生じやすく、耐えがたい疼痛を生じる。

また、膠原病では四肢皮膚の血管炎により、難治性の潰瘍を生じることがある。これらの病態は、しばしば免疫抑制療法に反応せず、難治性である。潰瘍が重症化すると病変が骨まで達して骨髓炎を併発したり、壊死に至り切断を余儀なくされることがありQOLの著しい低下を招いている。

膠原病に伴う血管障害の治療法としては、Ca拮抗剤⁽²⁾、prostaglandin E1製剤⁽³⁾、prostaglandin I2製剤⁽⁴⁾などの血管拡張剤が血流改善を目的として用いられている。しかし、これらの治療法は、血流改善効果が弱く、重症例に対しては奏功しにくいのが現状である。

2000年にアデノ随伴ウイルスをベクターとしてvascular endothelial growth factor (VEGF)遺伝子をラットの心筋および骨格筋へ導入することにより、生理活性のあるVEGFが産生・分泌され、血管新生が促進されることが報告された^(5,6)。さらに、生体末梢血中の単核球分画に内皮前駆細胞が存在し、この細胞は下肢虚血モデルにおいて血管新生部位に有意に組み込まれることが明らかにされた⁽⁷⁾。2002年には、TACT studyにおいて慢性動脈閉塞症患者の虚血肢に骨髓単核細胞分画の単回移植を行い、良好な成績が報告されている⁽⁸⁾。

このような背景の下、我々は膠原病に伴う血流障害を有する阻血指趾に対し、自己骨髓単核細胞分画および自己末梢単核細胞分画を単回移植し、自覚症状、手足末梢血流、手足末梢

皮膚表面温度、新生血管形成等について6症例、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、阻血指趾へ移植する細胞として、有効性は認めるものの自己骨髓単核細胞分画と自己末梢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⁽⁹⁾。

そこで、より患者に対する負担を軽減させるべく、自己骨髓血に代えて自己末梢血から単核細胞分画を採取し移植することとした。なお、G-CSF製剤の投与により多発性硬化症や関節リウマチなどの自己免疫性疾患が増悪したという報告もあることから⁽¹⁰⁾、G-CSF製剤を投与せずに末梢血を採取した。また、難治性の病変にも対応できるように、効果を持続させる目的で、繰り返し移植(4回/年)を行い、その効果と安全性について調査した。

方法

症例は、膠原病に合併した重症のレイノー現象、難治性潰瘍、指趾壊死を有する5例。症例1は、73歳男性。基礎疾患は、罹病歴14年の限局性全身性強皮症、レイノー現象は19年前より出現していた。治療前、右示指尖部に径1cmの難治性潰瘍が2ヶ所にみられていた。症例2は65歳男性。基礎疾患は、罹病歴10年の広汎性全身性強皮症、レイノー現象は6年前より出現していた。治療前、両手に強い冷感を伴う重症の血流障害が見られていた。症例3は61歳男性。基礎疾患は、罹病歴5年の混合性結合組織病、レイノー現象は6年前より出現していた。治療前、右母指尖部に径1cmおよび右中指尖部に径1.5cmの難治性潰瘍がみられていた。症例4は25歳女性。基礎疾患は罹病歴12年の広汎性全身性強皮症、レイノー現象は15年前より出現していた。治療前、右示指PIP関節に径2cm、右環趾尖部に径1cmの難治性潰瘍があり、右母趾尖部には径2.7cm、骨の一部が露出する深掘れの重症潰瘍がみられていた。症例5は66歳女性。基礎疾患は、罹病歴半年の顕微鏡的多発血管炎、レイノー現象は半年前より出現していた。治療前、左示指および左中指のDIP関節より遠位、

右中指および右小指のDIP関節より遠位、ならびに右環指尖部に径1 cm、左母趾尖部に径2 cmの進行性の壊死がみられていた。これらの壊死部は、免疫抑制薬に抵抗性であり、範囲が拡大しつつあった。プレドニゾロンは、症例2で5 mg/day、症例3と5で10 mg/day投与中であった。

移植に用いる末梢血単核細胞は、以下の手順で採取した。移植の前々日の午前に400 mlの全血を採取し、比重遠心分離法により単核細胞分画を分離した。単核細胞分画分離後の血液は速やかに患者に返血した。同日の午後にも同様に400 mlの全血から単核細胞分画を採取した。これら一連の操作を移植前日にも行い、計1600 mlの全血から単核細胞分画を採取した。翌日(移植当日)に分離した単核細胞分画をRPMI培地に懸濁して最終量8 ml~16 mlに調整したものを、0.2~0.4 mlずつ20~80カ所手掌および/または足底の骨格筋ないし骨膜下へ注入した。

上記の移植術を、3ヶ月ごとに1年間で計4回繰り返して行い、自覚的および他覚的評価を行った。評価は、冷感、疼痛および満足度のvisual analog scale (VAS)アンケート調査、サーモグラフィーによる皮膚表面温度測定、ankle brachial pressure index (ABI)測定、皮膚組織灌流圧 (skin perfusion pressure (SPP))測定、外観の評価、指尖毛細血管顕微鏡による指尖部の毛細血

管の状態の観察、およびMR-angiographyまたはdigital subtraction angiography (DSA)による血流の評価を行った。

結果

末梢血より採取された単核細胞数は 2.20×10^8 ~ 19.5×10^8 、CD34陽性細胞数は 0.06×10^6 ~ 1.91×10^6 であった(表1)。

疼痛、冷感、満足度に関するVASは、5症例全てにおいて1年後には治療前と比較して改善していた(図1A-C)。

サーモグラフィーにより測定した皮膚表面温度は、症例1~3では、上昇、下降を繰り返し、一定の傾向は見られなかったが、症例4、5では上昇傾向を示し、症例4では1年後に治療前と比較して2.8℃の温度上昇がみられた(図2A)。また、症例4では、治療前最も低温であった深掘れ潰瘍を有する右母趾の温度が、重点的に移植を行った結果1年後には他の趾と比較して最も温度が高くなっていた(図2B)。

ABIは、症例4と5で測定したが、症例4では潰瘍の無い左側では正常であったのに対して、深掘れ潰瘍がある右側ではABIが治療前0.78と低下していた。しかし、第1回目の移植治療により正常化した(図2C)。症例5では、治療前よりABIは正常であった。

表1

症例	1回目	2回目	3回目	4回目	
症例1	単核細胞数	3.16×10^8	4.80×10^8	11.40×10^8	5.30×10^8
	CD34陽性細胞数	0.06×10^6	0.31×10^6	0.38×10^6	0.15×10^6
症例2	単核細胞数	8.90×10^8	6.60×10^8	9.40×10^8	6.44×10^8
	CD34陽性細胞数	0.27×10^6	0.26×10^6	0.39×10^6	0.53×10^6
症例3	単核細胞数	2.20×10^8	3.78×10^8	4.54×10^8	6.46×10^8
	CD34陽性細胞数	0.11×10^6	0.20×10^6	0.28×10^6	0.29×10^6
症例4	単核細胞数	19.50×10^8	13.10×10^8	11.72×10^8	10.78×10^8
	CD34陽性細胞数	1.91×10^6	0.88×10^6	0.52×10^6	0.65×10^6
症例5	単核細胞数	9.68×10^8	10.18×10^8	9.16×10^8	予定
	CD34陽性細胞数	0.67×10^6	1.26×10^6	0.51×10^6	