

図1：疼痛/冷感/満足度 VAS の経時的変化。

- A は疼痛 VAS を示す。痛みが強いほど VAS 値は高い。
 B は冷感VASを示す。冷感が強いほど VAS 値は高い。
 C は本治療に対する患者満足度 VAS を示す。満足度が高いほどVAS値は高い。

SPPは、壊死病変がある症例5の左手掌で測定したところ、治療前70 mmHgと低下していたが、移植後半年で79 mmHgまで上昇した。

外観の評価は、症例1では治療前右手に難治性潰瘍が2ヶ所見られていたが(図3A)、1年後評価の時点で2か所とも完全に上皮化し治癒していた(図3B)。症例2では、治療前両手全指が血流障害により白色化していたが(図3C)、1年後評価の時点で白色化は消失していた(図3D)。症例3では、治療前右手に2ヶ所難治性潰瘍が見られていたが(図3E)、1年後評価の時点で2か所とも完全に上皮化し治癒していた(図3F)。症例4では、治療前右手に1カ所、右足に2ヶ所難治性の潰瘍が見られていた。移植半年後には右手の潰瘍および右環趾の潰瘍は

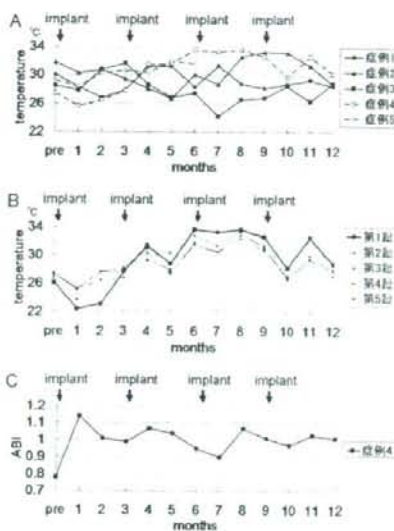


図2：移植後の皮膚温および血圧の推移。

- A は症例1～5で重点的に移植を行った指をサーモグラフィーで測定した指尖部皮膚表面温度を示す。
 B は症例4のサーモグラフィーで測定した右趾尖部の皮膚表面温度を示す。太線は重点的に移植を行った右母趾の先端部の温度を示す。
 C は症例4のABIを示す。

完全に上皮化し、1年後評価の時点で右母趾の深掘れ潰瘍も完全に上皮化し治癒していた(図4)。症例5では、治療前、左手に2ヶ所、右手に3ヶ所および左足に1か所進行性の壊死が見られていた。移植前は免疫抑制薬、プロスタグランディン製剤などの血管拡張薬投与にもかかわらず壊死は進行し続けていた(図5A、B)。しかし移植後から壊死の進行は止まり、移植2週間後には、移植を行った手指の腫脹が見られた(図5C、D)。半年後までに左示指と左中指の壊死部は自然に脱落し、壊死部脱落後の指尖部は上皮化していた(図5E)。

症例5で指尖毛細血管顕微鏡による爪境界部毛細血管観察を行ったところ、治療前は観察不能であった毛細血管が、移植半年後の時点で観

察可能であった(図6)。

DSAによる評価は治療前と1年後に行った(症例4はMR-angiography)。その結果、単核細胞分画の移植を行った症例2の左手および症例4の右足で描出される血管が増加していた(図7A-D)。

血清学的には、血清VEGF、IL-1 β 、FGF、

Endostatinの測定を行った。VEGFは、3か月毎に行った移植の直前の血清について測定したが、全症例とも一定の傾向は見られなかった(図8A)。しかし、症例4について、単核細胞採取前後および移植後短期間の血清VEGFを調べたところ、単核細胞採取前のVEGFと比較して、単核細胞採取後のVEGFは常に低下しており、移植後早期にVEGFは再上昇し、3ヶ月後には元に戻るという傾向がみられた(図8B)。IL-1 β 、FGFは移植前、移植後ともに全て感度以下であった。Endostatinは、治療前と比較して移植後の値は増加する症例もあれば低下する症例もあり、一定の傾向はみられなかった。

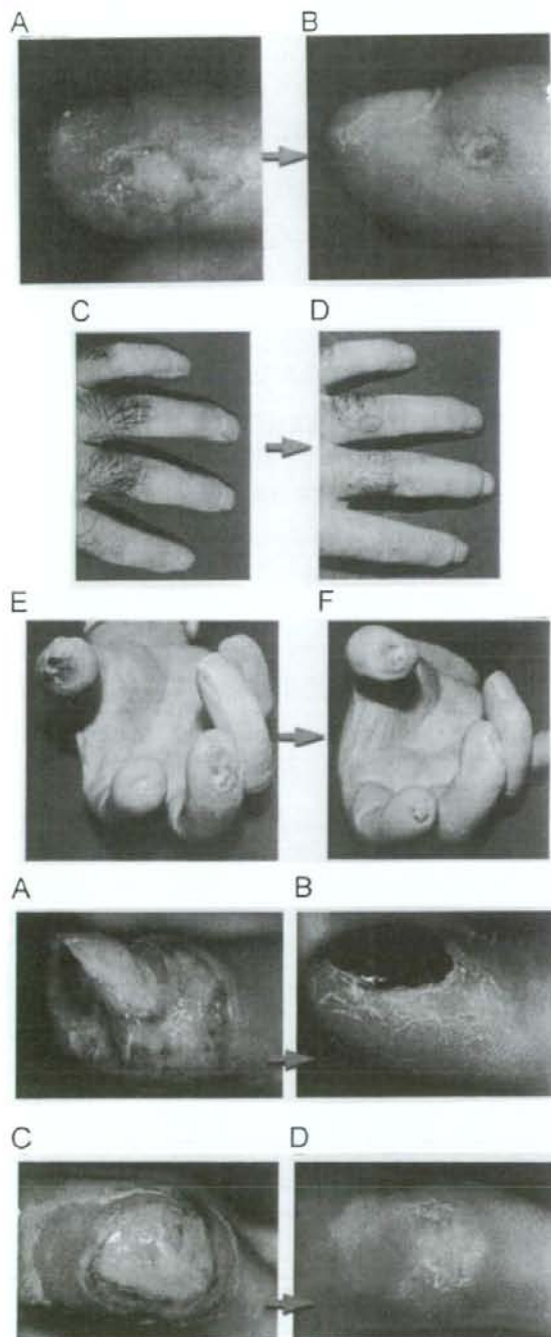
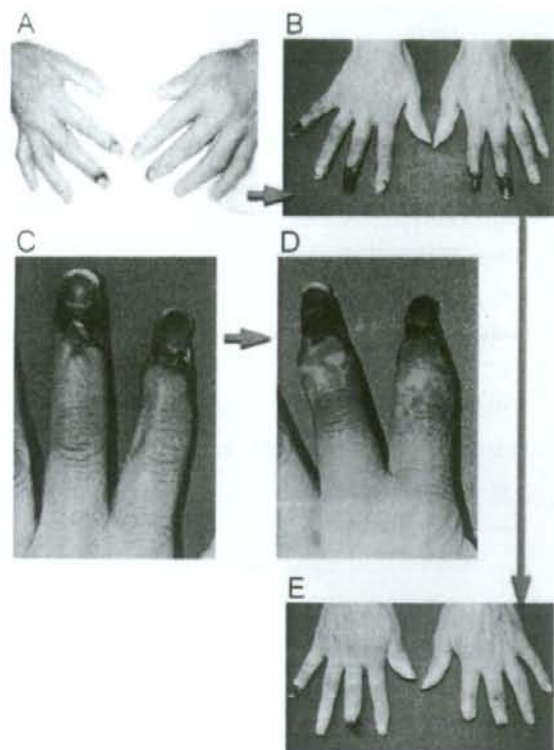


図3：移植後の皮膚色調と潰瘍の改善。

- A は症例1の血管再生治療前の右示指の指尖潰瘍を示す。
- B は治療1年後の同潰瘍を示す。
- C は症例2の血管再生術前の血流不良な左手指を示す。
- D は治療1年後の同部位を示す。
- E は症例3の血管再生治療前の右母指と右中指の指尖潰瘍を示す。
- F は治療1年後の同潰瘍を示す。

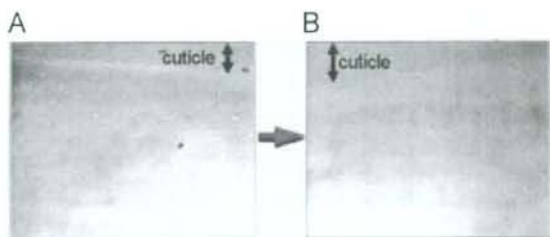
図4：移植後の潰瘍の改善。

- A は症例4の血管再生治療前の右母趾の潰瘍を示す。
- B は治療1年後の同潰瘍を示す。
- C は血管再生治療前の右示指 PIP 関節の潰瘍を示す。
- D は治療半年後の同潰瘍を示す。



←図5：指尖壊死部位の脱落と移植直後の浮腫。

- Aは血管再生治療開始2か月前の手の状態を示す。
- Bは治療開始直前の手の状態を示す。
- Cは血管再生治療直前の左示・中指を示す。
- Dは治療2週間後の同指の状態を示す。
- Eは治療半年後の手の状態を示す。



↑図6：爪床毛細血管ループの可視化。

- Aは症例5の血管再生治療前の左環指の指尖毛細血管顕微鏡写真を示す。
- Bは同部位の半年後の指尖毛細血管顕微鏡写真を示す。

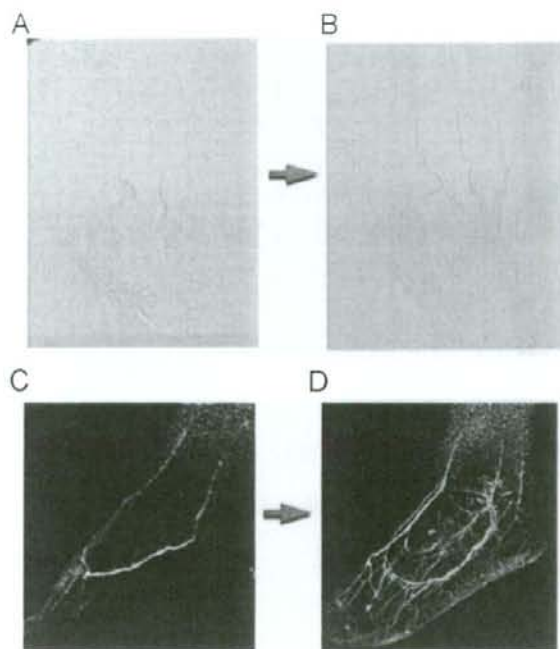


図7：移植前後での血管造影。

- Aは症例2の血管再生治療前の左手のDSA像を示す。
- Bは治療後の左手のDSA像を示す。
- Cは、症例4の血管再生治療前の右足のMR-Angiography像を示す。
- Dは治療後のMR-Angiography像を示す。

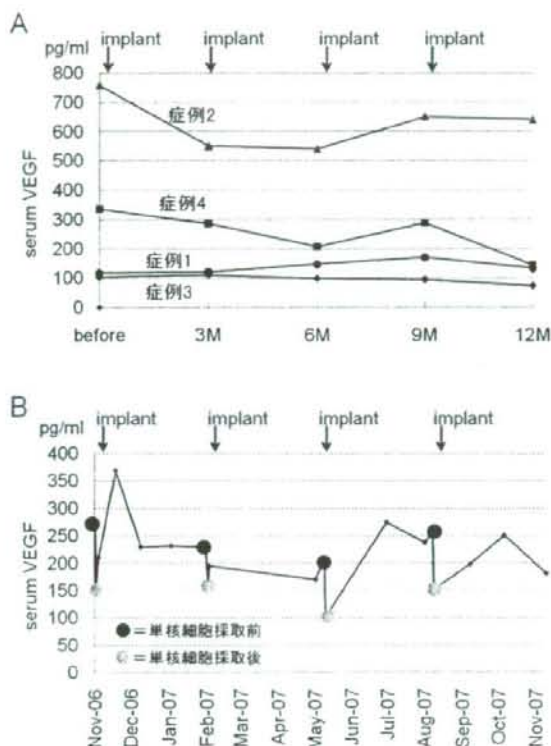


図8: VEGFの移植後経時的変化。

Aは症例1～4の3ヶ月毎の血清 VEGF 濃度を示す。

Bは症例4の血清 VEGF 濃度を示す。

考察

末梢血単核細胞分画移植による効果は、移植後約2週間前後から自覚的および他覚的に確認することができた。移植当日は注射部位の疼痛や腫脹がみられたが、移植2日後には注射部位の疼痛、腫脹ともに消失した。その後2週間程経過したころから潰瘍や壊死部を有する指の疼痛や冷感が軽減しはじめた。また、症例5では、移植から約2週間後に手指の腫脹が見られた。これらのことから、移植前まで著しく低下していた血流が、単核細胞分画移植を行うことで血管拡張が起こり、血流が増加することによって症状改善や手指腫脹がみられたものと考えられた。これら移植後早期にみられる効果は、angiogenesisによるものではなく、移植した単核細胞が産生したサイトカインや二次的に産生された血管拡張物質などによる血管拡張作用、

除痛作用が主体であると考えられた。

疼痛については、症例1と3では、軽快傾向にあった潰瘍が経過中再発したため一旦改善したVASは経過中に悪化している。しかし、その後潰瘍の軽快とともにVASも改善した。症例2は移植前から疼痛は見られなかった。症例4、5は潰瘍の軽快に伴いVASも改善していった。また、冷感については、症例1-3では移植を繰り返すことにより治療開始後10ヶ月程経過した頃から改善が見られた。症例4、5では、1回目の移植後から冷感は順調に軽減していった。このように、症例1-3と症例4、5との間で効果の持続期間や再発の有無に関して差が生じたのは、症例1-3と比較して症例4、5では移植した単核細胞数およびCD34陽性細胞数が多かったことに起因している可能性が考えられた。

サーモグラフィーによる指尖部表面温度の評価では、症例1-3では継続的な温度上昇は見られなかったが、症例4、5ではほぼ一定の傾向で温度上昇していった。また、重点的に移植を行った症例4の深掘れ潰瘍がみられた右母趾は、移植前最も温度が低かったにも関わらず、1年後には最も温度が高くなっていった。この結果から、移植部位の表面温度を上げるほどの血流改善を得るためには、局所に重点的に移植する必要がある、移植する単核細胞数またはCD34陽性細胞数は多いほうがより効果的である可能性が示唆された。症例4では移植によりABIの改善が見られたが、これも治療前の下肢の血流低下が移植後に改善したのと考えられた。症例5の移植後SPP上昇に関しても移植による血流量増加を反映しているものと考えられた。

血清 VEGF に関しては、症例4で末梢血単核細胞分画採取後に血清 VEGF は一旦低下し、移植後早期(2週後)に増加し、3ヶ月後には元に戻るという傾向がみられた。これは、末梢血単核細胞分画採取により、末梢血中でVEGFを合成・放出する単核細胞数が急激に減少したため血清 VEGF の濃度が低下したと考えられた。移植によって単核細胞を筋肉内または骨膜下に注入移植することにより、単核細胞で合成された VEGF が組織中に大量に放出され、末梢血液中

にはいることにより、移植後の血清 VEGF 濃度は再度上昇するものと考えられた。また、組織中の単核細胞の寿命は数週間であるため、3ヶ月後の移植直前の血清では VEGF 濃度は元に戻ってしまっていたと推測された。

安全性については移植早期の移植部位近傍の疼痛および腫脹を除いて、これまで最長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。

結 語

末梢血単核細胞分画の繰り返し移植により、膠原病に伴う末梢血管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。

単核細胞分画の採取は、骨髓血と比較して末梢血の場合、患者負担が極めて少なく、また末梢血由来の単核細胞分画でも骨髓血由来のものと同等の効果が得られることから、末梢血単核細胞分画を用いた血管再生療法は有用な方法であると考えられた。さらに末梢血を使用することにより、繰り返し移植が可能となり、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血流障害には特に適した方法であると考えられた。

文 献

- 1) Vajda K, Kádár A, Káli A, Urai L. Ultrastructural investigations of finger pulp biopsies: a study of 31 patients with Raynaud's syndrome. *Ultrastruct Pathol* 3: 175-186, 1982
- 2) Smith CD, McKendry RJ. Controlled trial of nifedipine in the treatment of Raynaud's phenomenon. *Lancet* 11: 1299-301, 1982
- 3) Langevitz P, Buskila D, Lee P, Urowitz MB. Treatment of refractory ischemic skin ulcers in patients with Raynaud's phenomenon with PGE1 infusions. *J Rheumatol* 16: 1433-1435, 1989
- 4) Kirby JD, Lima DR, Dowd PM, Kilfeather S, Turner P. Prostacyclin increases cyclic-nucleotide responsiveness of lymphocytes from patients with systemic sclerosis. *Lancet* 30: 453-454, 1980
- 5) Maeda Y, Ikeda U, Shimpo M, Shibuya M, Monahan J, Urabe M, Ozawa K, Shimada K. Adeno-associated virus-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer into cardiac myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 36: 438-443, 2000
- 6) Shimpo M, Ikeda U, Maeda Y, Takahashi M, Miyashita H, Mizukami H, Urabe M, Kume A, Takizawa T, Shibuya M, Ozawa K, Shimada K. AAV-mediated VEGF gene transfer into skeletal muscle stimulates angiogenesis and improves blood flow in a rat hindlimb ischemia model. *Cardiovasc Res* 53: 993-1001, 2002
- 7) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 14: 964-967, 1997
- 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) Kamata Y, Takahashi Y, Iwamoto M, Matsui K, Murakami Y, Muroi K, Ikeda U, Shimada K, Yoshio T, Okazaki H, Minota S. Local implantation of autologous mononuclear cells from bone marrow and peripheral blood for treatment of ischaemic digits in patients with connective tissue diseases. *Rheumatology (Oxford)* 46: 882-884, 2007
- 10) Burt RK, Fassas A, Snowden J, van Laar JM, Kozak T, Wulffraat NM, Nash RA, Dunbar CE, Arnold R, Prentice G, Bingham S, Marmont AM, McSweeney PA. Collection of hematopoietic stem cells from patients with autoimmune diseases. *Bone Marrow Transplant* 28: 1-12, 2001

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」

分担研究者 天野 純¹

研究協力者 福井大祐¹、和田有子¹、越川めぐみ³、下平滋隆³

池田宇一²

信州大学附属病院 先端心臓血管病センター

信州大学医学部心臓血管外科¹、循環器内科²、輸血部³

1：自己骨髄細胞移植症例について平成19年度までの報告に2例症例を重ねて報告する。平成21年2月現在までに、当院にて自己骨髄細胞移植を施行した25例の奏効率は72%であったものの、非Buerger病症例のBMI奏効率55%は、Buerger病症例の85%に比し不良であった。また、皮膚潰瘍病変の急性増悪期に自己骨髄細胞治療を施行した症例の奏効率は14%と不良であり、感染を合併していた3例の奏効率は0%といずれも不良であった。

2：マウス下肢虚血モデルを用い、細胞外マトリックスであるフィブロネクチンが骨髄幹細胞移植にもたらす効果について検討し、フィブロネクチン/BMI併用療法について平成19年度に引き続き検討を加えた。フィブロネクチンの単独投与群、骨髄細胞移植群および併用群とコントロール群についてレーザー Doppler 血流計を用いて比較したところ、治療群にコントロール群に比し有意な改善を認めた。また、有意差は認められなかったものの、併用群において比較的良好な改善傾向を示した。

本年度は、重ねた臨床症例の報告とともに、平成19年度に引き続き、マウス下肢虚血を用いた細胞外マトリックスであるフィブロネクチンの筋肉内投与が骨髄幹細胞移植にもたらす効果について検討したので各々について報告する。

1：平成20年度までの信州大学における自己骨髄細胞移植（bone marrow implantation: 以下BMI）による重症虚血肢治療の現状

緒言

信州大学では、内科的・外科的治療法では症状改善が困難と判断される重症虚血肢に対し、平成15年11月より平成21年2月現在までに自己骨髄細胞移植による血管再生療法をのべ25例（22症例）に対し施行してきた。移植後の臨床効果判定は、自覚症状の変化（無痛歩行時間、

疼痛スケール、四肢潰瘍面積）・ABI・DPI・サーモグラフィー・動脈造影検査等を用いて行い、その治療成績について平成16年度～19年度の班会議において報告してきた。平成21年2月現在までにBMI療法を施行した25例について重ねた症例の問題点を中心に報告する。

方法

平成19年度の報告以降2例症例を重ね、平成15年11月より平成21年2月現在までにBMI療法を25例に対し施行した。治療方法は、平成15

年11月より平成21年2月現在まで変わっていない。

結果

BMI症例 25 例の対象疾患の内訳を表1-1に示した。さらに表 1-2 に示した通り FontaineⅢ°以上の重症虚血肢は全体の92%を占め、複数肢

に移植した症例は全体の48%であった。全体の奏効率は72%（有効18例、無効7例）であった。平成19年度の報告以降に治療を行った2例は、antiphospholipid antigen syndrome (APS)症例、及び Behcet 病症例であり、ともに皮膚潰瘍病変の急性増悪症例に対し移植を行ったが、無効であった。

表1-1 信州大学におけるBMI症例

Diagnosis	Number of Cases
Buerger disease	15 (60%)
Atherosclerosis obliteran (ASO)	2 (8%)
progressive systemic sclerosis (PSS)	1 (32%)
CREST syndrome	2
antiphospholipid antigen syndrome (APS)	3
pseudoxanthoma elasticum (PXE)	1
Behcet Disease	1
Total	25

表1-2 信州大学におけるBMI症例

re-do cases		2 cases
Fontaine	II	2 cases
	III	6 cases (92%)
	IV	17 cases
移植対象肢	1肢	13 cases
	2肢	10 cases (48%)
	3肢	2 cases
効果	有効	18 cases (72%)
	不変・無効	7 cases
	再発	1 cases

表 2に奏効率の検討結果について示した。BMI症例全体で検討すると、バージャー病に対する奏効率は85%と良好であったが、非バージャー病症例の奏効率は55%に留まった。また、皮膚潰瘍病変の急性増悪症例7例に限ると奏効率は14%と不良であり、さらに、BMIにて奏効を得た後、再増悪のため再移植を施行した2例および皮膚潰瘍に中等度以上の感染を伴って

た3例については、全例無効であった。

さらに、これらの症例に対する各種検査 (Thermography, DPI, DSA) と臨床症状の相関を表3に示した。Thermographyのsensitivityは83%で定量的でない欠点はあるものの比較的的良好で、DPIのsensitivityは56%に留まっており、DSAについては41%であった。

表2 奏効率の検討

奏効率	18/25 (72%)
Burger 病	12/14 (85%)
非Burger 病	6/11 (55%)
rapid progression	1/7 (14%)
re-do cases	0/2 (0%)
infection	0/3 (0%)

表3 各種検査と臨床症状の相関

	奏効率	sensitivity
clinical results	18/25 (72%)	<small>examination effective case / clinical effective case</small>
Thermography	15/22 (68%)	15/18 (83%)
DPI	10/22 (45%)	10/18 (56%)
DSA	5/12 (41%)	5/12 (41%)

考察

BMI臨床施行例について平成19年度までの報告に2例症例を重ねて報告した。非 Buerger 病症例の BMI 奏効率55%は、

Buerger病症例の85%に比し、明らかに不良であった。疾患別に分類すると、各々の症例数は少なく今後検討を要するものと考えられ、また、他に治療法の選択肢のない重症虚血肢において

の奏効率としては、治療法として十分選択し得る成績とも考えられる。しかし、皮膚潰瘍病変の急性増悪期にBMI治療を施行した症例の奏効率は14%と不良であり、感染を合併していた3例の奏効率は0%といずれも不良であった。現在、当院では症状の安定した状態で皮膚潰瘍の感染コントロールのついた状態での適応を基本的に推奨しているが、症例によっては難しい選択を余儀なくされる場合も少なくない。

また、初回BMI治療にて一時的に奏効し再増悪を認めたためBMI re-doを施行した2症例はいずれも無効であった。この結果については、症例数も少なく、原因は明らかではないが今後検討を要する課題である。

信州大学における閉塞性動脈硬化症の治療症例は、初期にBMIを施行した2例を除いて全例とも血管内治療ないし外科的治療にて治療され、自己骨髄細胞移植を施行した症例はなかった。このため、BMIを施行する症例は、基本的にBuerger病を含めた難治性血管炎症例のみとなっている。この傾向は今後も続くものと考えられ、ASOに比べ症例数は少ないものの難治性血管炎に対する治療としての自己骨髄幹細胞移植治療の重要性は今後さらに高まるものと考えている。

2: マウス下肢虚血モデルを用いたフィブロネクチン/骨髄幹細胞移植 併用療法の検討

緒言

生活習慣の改善、薬物治療、カテーテル治療、バイパス手術などの治療が不可能な重症下肢虚血患者に対し、虚血部位に血管新生因子や細胞移植を行うことによって血管新生を促進しようとする治療的血管新生の臨床応用が試みられるようになってきた¹⁻⁸。特に細胞療法はこの分野で最も臨床応用の進んだ治療法であり、これまでに自己骨髄幹細胞や末梢血単核球分画を用いた方法などが開発され、本邦では世界に先駆けて重症虚血肢患者に対するBMIの臨床応用が2000年より始まり一定の効果をあげている⁹。しかし、本治療の対象となる患者背景は、狭心

症や脳梗塞など他の動脈硬化疾患の合併、高齢、慢性腎不全の合併などハイリスクであることが多いため、全身麻酔下での大量の骨髄細胞採取(一般的に600 ml以上)が適応拡大の制限となっている。

実際大量の骨髄細胞(一般に $3-5 \times 10^9$ 個、うちCD34陽性細胞 $2-7 \times 10^7$ 個)を移植しているにもかかわらず、48時間以内にその80%がアポトーシスに陥り、組織内に留まり血管新生に寄与するのは全移植細胞の数%にすぎないと予測されており、さらに最終的に血管内皮細胞に分化すると思われる血管内皮前駆細胞は骨髄CD34陽性細胞の1%以下ともいわれている。

移植細胞の低生着率にもかかわらず、本治療法が一定の効果をあげている理由として、本治療法における血管新生が、従来考えられていたような移植骨髄単核球細胞の血管内皮細胞への分化および血管構築というメカニズムによるだけでなく、血管新生因子やサイトカインを分泌する移植細胞のパラクライン作用により間接的にもたらされている可能性が示唆されるようになってきた。移植された細胞により刺激された虚血骨格筋組織が、多様な血管新生因子・サイトカインを大量かつ持続的に産生することが本治療の主要なメカニズムであると示唆する報告もあり¹³、この場合局所において血管内皮細胞に分化し血管新生に直接関与するのはレシビエント血液中を循環する血管内皮前駆細胞であると思われる、移植細胞はレシビエント細胞が局所に定着、分化する微小環境を整える役割を担うものという可能性も考えられる。

また本治療法においては基礎疾患、症例によってその効果発現が一定でなく現状では治療効果の予測がつけ難い点も指摘されており、従来行われてきた外科的治療に比べ患者個人による治療への反応性の違いが大きな問題となっている。このこともまた、虚血局所における宿主側の微小環境の差として考えられる。

したがって宿主側の微小環境を細胞接着および血管新生に適した状態にすることは、移植細胞の生着率を上げることはもちろん、それ以上に血管新生増強効果をもたらすものと思われる。

る。これまでに骨髓細胞の生着率の向上を目的とした宿主側の微小環境改善の手段が探られてきたが、優れた補助療法は必要移植細胞数を減じ本治療法の適応拡大にも寄与するものと期待される。

これまでに BMI 併用療法として、細胞外マトリックスや細胞接着因子などの、細胞の接着性を高める物質との併用が考えられており、Erik J. Suuronen らは *in vivo* でのコラーゲンタイプ I と骨髓細胞移植との併用が効果的であったと報告している¹⁴⁻¹⁶。今回我々は、細胞外マトリックスとして広く体内に分布し細胞接着因子の一つとして機能しているフィブロネクチンに注目し、骨髓幹細胞移植の補助手段として試みた。

フィブロネクチンは体内に広く分布するプロテオグリカンで、細胞表面のレセプター分子であるインテグリン、コラーゲン、フィブリン、ヘパリンなどと結合して細胞の基質への接着・伸展、細胞移動の促進、細胞形態の調整など、様々な生理機能を示す¹⁷。実験系では造血細胞、線維芽細胞、内皮系の細胞培養に適し、HUVEC 培養におけるフィブロネクチンコートの使用は濃度と比例して細胞の増殖能も上がることも報告されており¹⁸⁻²⁰、血管を構成する際に必要とされている内皮細胞の接着に関わる細胞外マトリックスである。

本研究は、マウス下肢虚血を用い、フィブロネクチンが骨髓幹細胞移植にもたらす効果について検討し、フィブロネクチン/BMI併用療法の可能性を考察する目的で行われた。

方 法

マウス下肢虚血モデルの作製

モデル作製法

C57BL/6Nマウス[日本チャールズリバー]のオス(7~9週齢)を、信州大学ヒト環境科学研究支援センター動物実験部門で飼育し、実験に用いた。3.6%抱水クロラール(400 μ L/kg)[ナカライテスク株式会社]を用いて腹腔内投与と麻酔をした。腹部から下腿の消毒および除毛を行ったのち左下総大腿動脈と外腸骨動脈、膝窩動脈と

伏在動脈の分岐までの動静脈を7-0プロリン[ETHICON]で結紮、切除した。創内を生理食塩水で洗浄後、創を5-0ナイロン糸[株式会社アズウェル]にて縫合した(図1)。

本研究における動物実験は信州大学医学部動物実験指針に沿ったものであり、信州大学医学部動物実験委員会の承認を受けている。(実験計画書No.190076)

レーザードップラー血流計による血流測定

マウスを上記方法にて全身麻酔後、Moor LDI レーザードップラーイメージ[Moor Instruments]を用いて、マウス下肢の血流を測定した。下腿から指先までの血流を患側、健側の両側について定量し、患肢/健肢比にて表わした。血流測定はモデル作製直後、移植日、移植後1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21日目に行った。

骨髓細胞移植法とフィブロネクチンの投与 骨髓細胞採取

C57BL/6Nマウスのメスの左右の大腿骨を切除し、大腿骨の両端を切除、骨断端に注射針[26G、5 mLシリンジ、Terumo]を刺し、適量のPBS(-/)(GIBCO)を流し込み、ディッシュにあげ、懸濁。セルストレーナー(40 μ mナイロン)[BD falcon]で50mLチューブに移し、遠心させ(1000rpm、5min、RT)、その後ACK Buffer[NH₄Cl 4.145g、KHCO₃ 0.5g、EDTA-2Na、0.0211g、DAW 500mL]を添加し、氷上にて20分静置し、血球成分を溶血させ、さらに遠心し、骨髓単核球細胞を分離・精製(4 \times 10⁶ cell/mL)した。

フィブロネクチン投与濃度の決定

フィブロネクチン(Fibronectin, from Human plasma)[SIGMA]をPBSに溶解し、フィブロネクチン溶液を作製(800 μ g/mL、400 μ g/mL、200 μ g/mL、100 μ g/mL)(n=4)これを250 μ Lずつ虚血作製一日後のマウスの下肢筋肉(血管切除部周辺)6ヶ所に注射器[マイJECTター1/2、Terumo]で投与した(図1)。また、評価については移植後14日目までの患肢/健肢血流比によって行った。

骨髄単核球細胞移植及びフィブロネクチンの投与
 フィブロネクチン単独投与群 (n=4)、BMI群 (n=4)、フィブロネクチン投与/BMI併用群 (以下併用群) (n=4)、コントロール群 (n=4) の4を作製した。

フィブロネクチン単独投与群は、ヒトフィブロネクチン (400 μ g/mL) を虚血作製一日後に全量250 μ Lとして下肢の筋肉6ヶ所に投与した。

BMI群は分離された骨髄単核球細胞 (1×10^6 cell/250 μ L) を虚血作製一日後に全量250 μ Lとして下肢の筋肉6ヶ所に投与した。

併用群は、虚血モデル作成後一時間以上後にフィブロネクチン (400 μ g/mL、250 μ L) を前処置として筋肉注射にて6ヶ所に投与し、一日後に骨髄細胞 (4×10^6 cell/mL、250 μ L) を筋肉注射にて6ヶ所に移植した。

コントロール群はPBS 250 μ Lを筋肉注射にて6ヶ所に投与した (図1)。

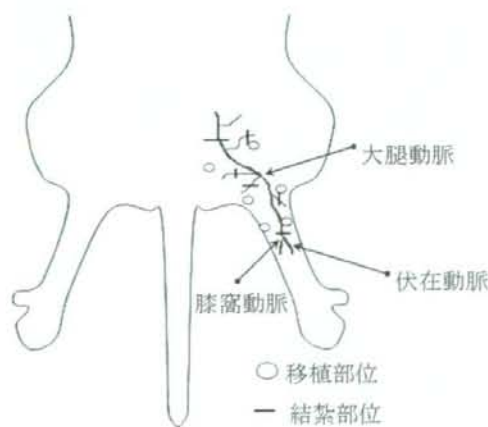


図1. マウス下肢虚血モデルの作製

組織学的解析

摘出標本のpreparation

虚血モデル作製後21日目に股関節からマウス両下肢を離断し、上部・中部・下部に分けた後20%中性緩衝ホルマリンにて固定後、50倍希釈のK-CX脱灰液[株式会社ファルマ]で一夜浸漬し、浸漬後に3時間流水で水洗いし、脱灰を行った。これをエタノールで脱水処理してパラフィン包埋し、短軸方向に3 μ mの厚さに薄切し、

スライドガラスにのせ24時間42℃で風乾した。

HE染色

脱パラフィン後、ヘマトキシリンで1分染色し流水にて10分間洗浄した後、0.5%エオジン溶液で2分染色した。染色後脱水、透徹および封入し光学顕微鏡で観察した。

免疫染色及び微小血管数の比較

脱パラフィン後、クエン酸溶液に浸し、電子レンジで6分間2回加熱し組織上のホルマリン架橋をはずした。PBSで洗浄後、0.3%過酸化水素水混メタノールに浸し室温にて30分間インキュベーションし内因性ペルオキシターゼ処理を行った。蒸留水およびPBSで洗浄後、blockace [大日本製薬株式会社]5倍希釈液を用いて60分間室温でインキュベーションしblocking処理を行った。一次抗体反応は抗CD31抗体 (CD31 Rabbit antibody) [SPRING BIOSCIENCE]を50倍希釈して4℃で一晩行なった。PBSで洗浄後、二次抗体反応は抗 rabbit IgG抗体 [VECTOR LABORATORIES]を200倍希釈で、60分間室温で行なった。PBSで洗浄後、ABCキット [VECTOR LABORATORIES]を用い、ビオチン・アビジン反応を行った。PBSで洗浄後、DABタブレット[WAKO]をPBS40mlで溶解し過酸化水素水20 μ Lを加えた後浸透し発色させた。蒸留水洗浄後、ヘマトキシリンで核染色を行った。蒸留水洗浄、脱水、透徹、封入し、微小血管を数え各群を比較した。

統計方法

統計分析はエクセル統計2006ソフト[株式会社 社会情報サービス]を用いて行なった。測定される変数の変化は対t検定を用いて分析し、評価した。結果はmean \pm SEM (標準誤差) として表し、Pの値が0.05未満だったとき、統計学的に有意であると考えた。

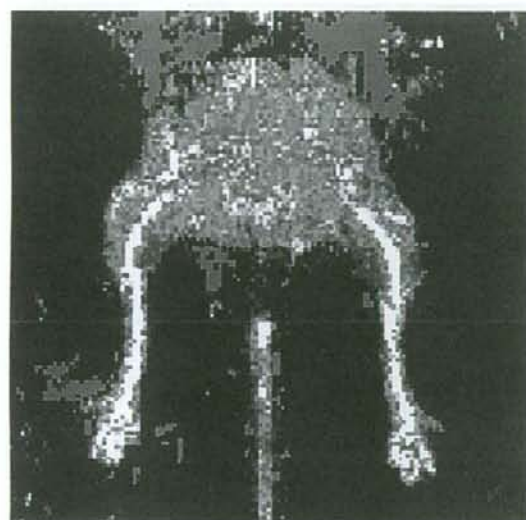
結果

マウス下肢虚血モデルにおける経時的血流変化
 マウス下肢虚血モデルの術前および術直後のレーザードップラーの写真を図2に示した。無処置の右下肢に比べ、動脈を結紮した左下肢で

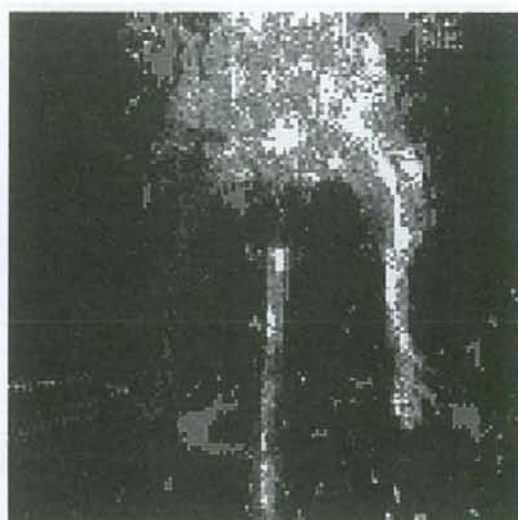
は大腿部および下腿部の血流が低下している。図3、4はレーザードップラーによる血流変化を定量化し健肢との比によって経時的に示したものであり、図5は図4における術後、移植後5日、21日のドップラー画像を示したものである。患肢/健肢血流比は術後0.05 (<5%)まで低下し2週間でコントロール群においても0.6 (60%)まで回復する。

フィブロネクチンを100 μ g/mL、200 μ g/mL、400 μ g/mL、800 μ g/mLの濃度で単独投与を行った場合(図3)、有意差は見られないものの、400 μ g/mL以上の投与で血流が改善する傾向にあった。フィブロネクチンの生理的血漿中濃度は約300 μ g/mLであるため、以降の実験はフィブロネクチン濃度を400 μ g/mLに調整して進めることとした。

治療群(フィブロネクチン単独投与群、骨髄細胞移植群および併用群)とコントロール群を比較した場合、両群は術後3日目より血流の改善が認められ、治療群は術後5日目にコントロール群よりも血流が回復した。コントロール群は移植後14日目以降、大きな血流改善はみられないものの、治療群については移植後14日目以降も血流改善がみられた。移植後21日目において、治療群とコントロール群に有意差が認められた(図6)。また、治療群での比較では、移植後21日目の患肢/健肢比において、有意差は認められなかったものの、フィブロネクチン単独投与群 0.79 ± 0.02 、骨髄細胞群 0.79 ± 0.03 、併用群 0.91 ± 0.12 と併用群が最も血流改善がよい傾向がみられた。(図4,5,6)。



Pre Surgery



After Surgery

図2. レーザードップラーによる血流測定

微小血管数の比較

モデル作製後21日目の組織における微小血管密度を比較するために、血管内皮細胞に対するマーカーのひとつである抗CD31抗体による免疫染色を行った。

コントロール群、治療群いずれにおいても、虚血肢の筋肉内にCD31陽性細胞を認めた。CD31陽性細胞は骨格筋細胞間に浸潤するよう

に散在し、微小血管と思われる管腔構造を形成するものも観察された(図7)。

この微小血管数を面積あたりの血管数で比較すると、治療群はコントロール群に比べ有意に血管数が多かった。また、併用群と骨髄細胞群には有意差は認めないものの併用群の血管数が最も多い傾向がみられた(図8)。

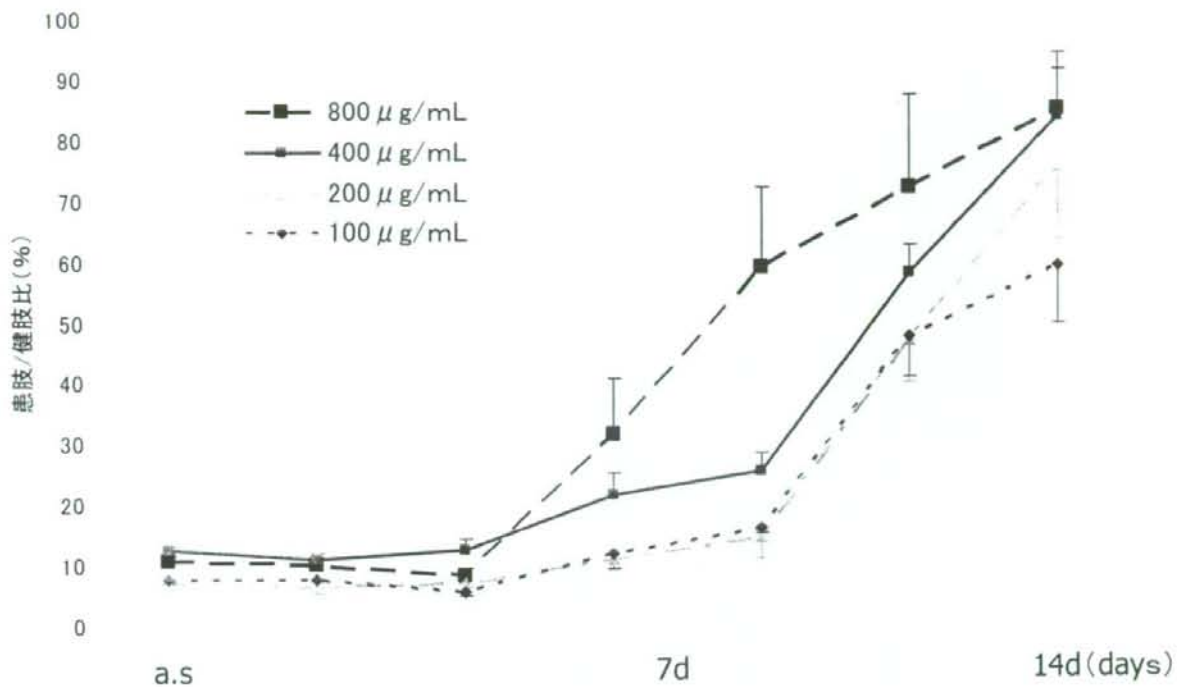


図3. フィブロネクチン単独投与における下肢血流変化

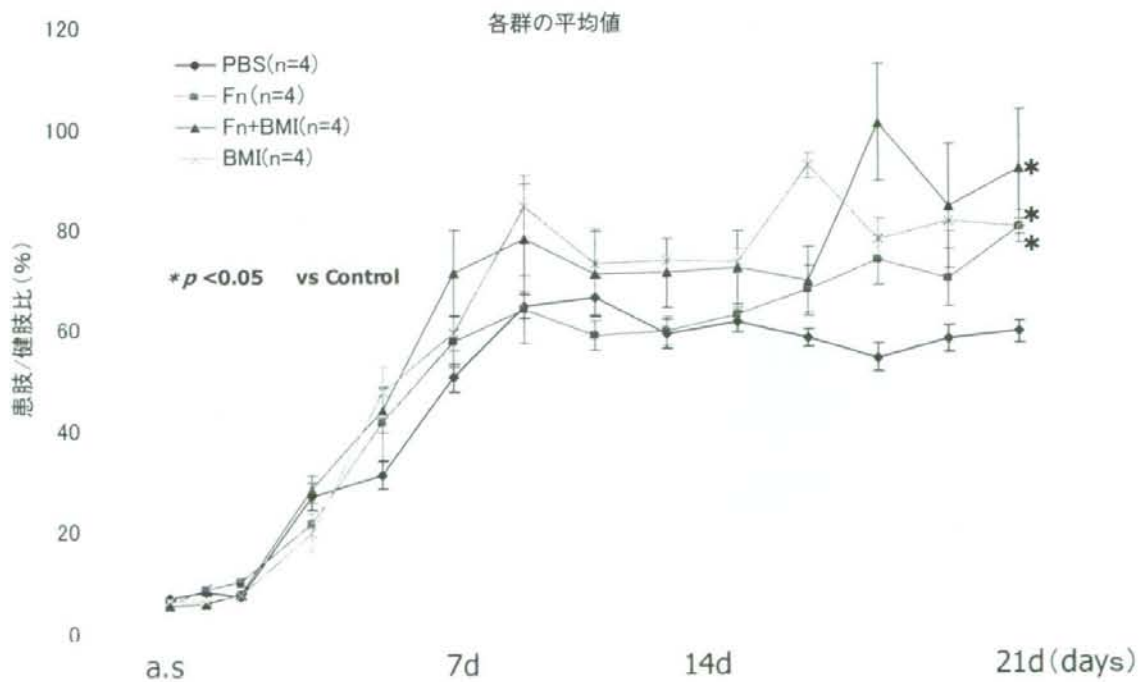


図4. 各治療群における下肢血流変化

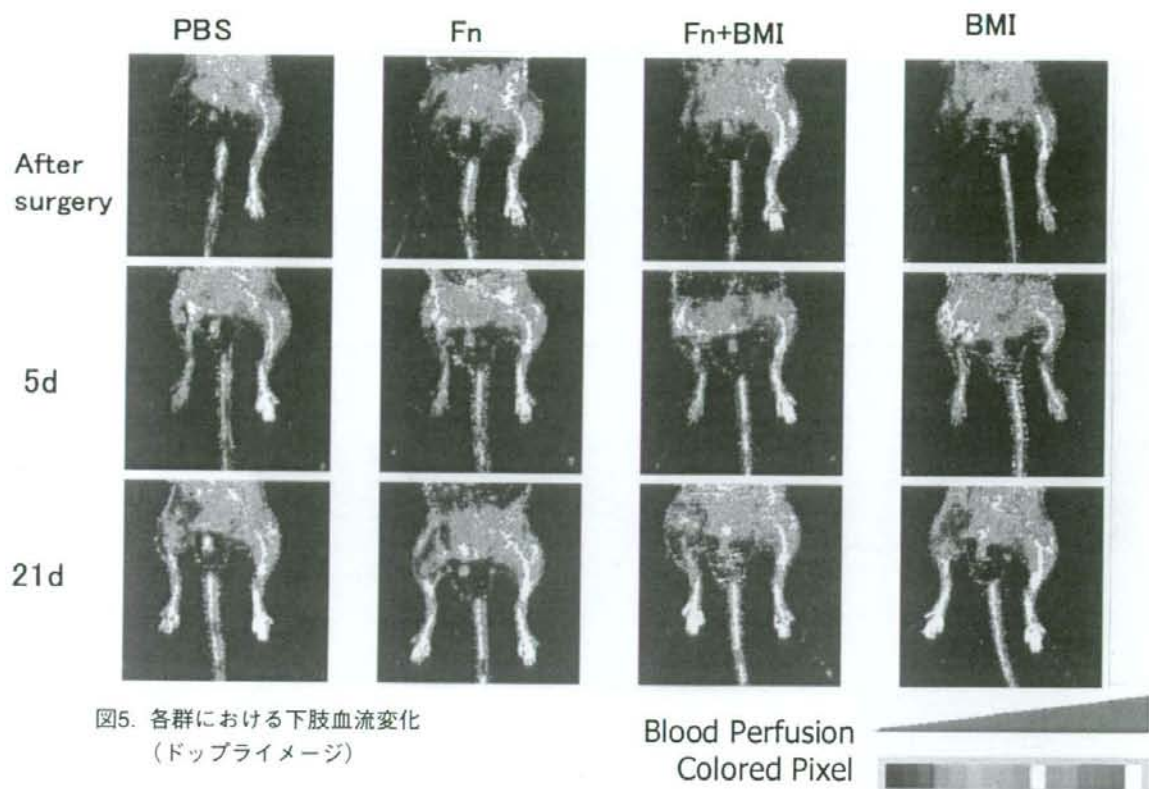


図5. 各群における下肢血流変化
(ドップライメージ)

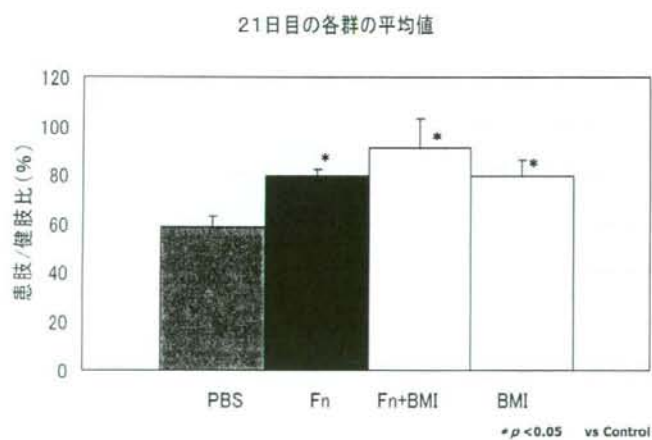


図6. 21日目における各群の平均値

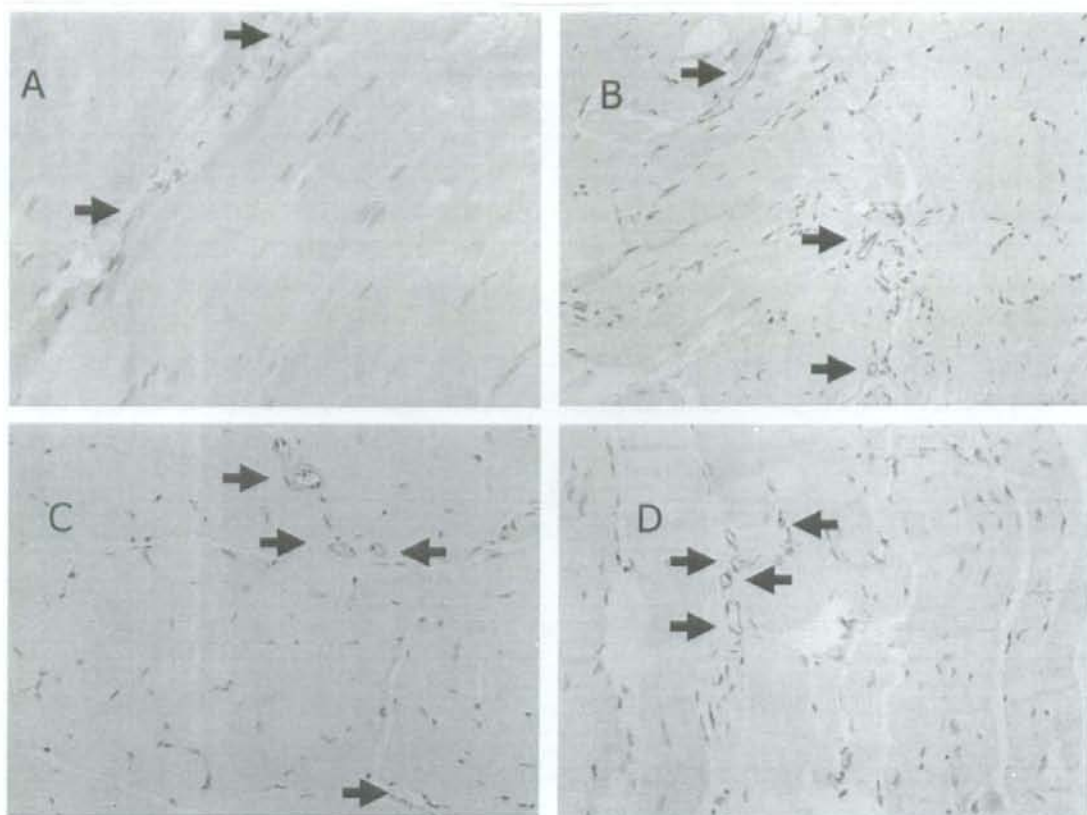


図7. CD31陽性細胞の免疫染色 (A:PBS, B:Fn, C:Fn+BMI, D:BMI, $\times 400$)

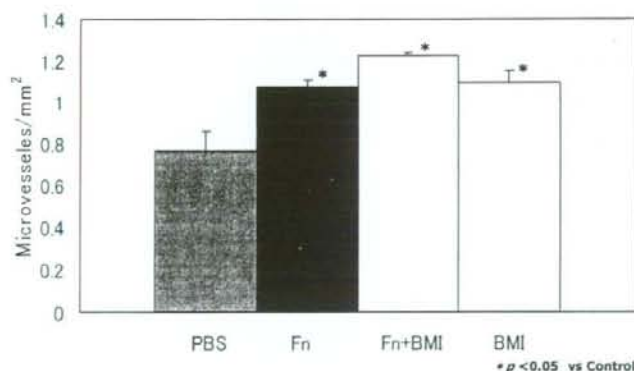


図8. 微小血管のカウント

安全性

図には示していないが HE 染色での検討の結果、局所の浮腫や組織壊死などについてはフィブロネクチン単独投与群と非投与群の間に差を認めず、少なくとも $800 \mu\text{g/ml}$ の濃度までのフィブロネクチン投与による組織障害性は観察されなかった。

考察

BMIによる血管新生療法の効果発現のメカニズムには未だ不明な点が多い。Isnerらは1994年に、ウサギ下肢虚血モデルに対する組み換え VEGF 蛋白を経動脈的に投与し、血流の改善と虚血部での血管新生を認めたことを報告した¹。

さらに彼らは1996年に VEGF 遺伝子をヒト虚血肢筋肉内に直接注入し、虚血性潰瘍の治癒や安静時疼痛の改善を認めたことを報告した²。この時点では成人における血管新生は既存の内皮細胞の増殖によると考えられていたが、1997年に Asahara ら⁶が骨髄に由来する内皮前駆細胞が

未分化な状態で血液単核球中に含まれ、末梢血に動員され血管発生に関与することを報告し^{7,8}、BMIによる血管新生療法が研究されるようになった²³⁻²⁵。本邦では重症虚血肢患者に対するBMIの臨床応用が2000年より始まり、2002年にTateishiら⁹により重症虚血患者に対するBMIの有効性と安全性が報告される一方、効果発現が症例や基礎疾患により異なり、現段階では治療効果の予測が付け難い点が難点とされている。極めて有効である症例がある一方で、効果が不十分な症例も少なくなく、効果発現のメカニズムの解明とともに治療効果の向上にむけた取り組みが必要である。

フィブロネクチンは血漿中に約300 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で含まれる糖たんぱく質であるが、同時に細胞外マトリックスとして組織内に広く分布し、細胞接着、分裂、細胞遊走といった様々な機能を担う多機能蛋白質である。VEGFと特異的に結合するHeparin-II Domainを有し、VEGF/フィブロネクチン複合体は内皮細胞の増殖過程におけるもっとも重要な因子のひとつである²⁶。フィブロネクチンはVEGFによって誘導されるCD34陽性細胞の虚血部位への遊走、血管内皮細胞への分化を促進する²⁷。またVEGFR-2を介したErkのリン酸化はフィブロネクチンの存在下に、より低いVEGF濃度によって惹起されることが示されている^{21,26}。さらにVEGFによって引き起こされる内皮細胞の遊走能および増殖能は、フィブロネクチンあるいはフィブロネクチンのHeparin-II Domain サイト (VEGF binding site) およびRGD サイト (integrin binding site) のフラグメント投与によって著しく増強される^{21,27,28}。HUVEC 培養におけるフィブロネクチンコートの使用は濃度と比例して細胞の増殖能も上がることも示されており、*in vitro* / *in vivo* いずれの実験系においてもフィブロネクチンがVEGFと共同して内皮細胞の分化誘導、増殖、血管新生に関わっていることを裏付ける報告がある²⁹⁻³²。我々は、本研究においてフィブロネクチンが虚血骨格筋内で発現しているVEGFの血管新生作用を増強し、BMI効果を向上させる可能性について検討した。本研究で用いた虚血肢モデルは無治療においても側副血行

路の発達により2週間で患肢/健肢血流比は0.6前後まで回復しこれは4週間目においても変わらない。また、治療群においては、2週間目以降も血流の改善がみられ、3週間目から4週間目でプラトーに達する。したがって本研究は3週間までの血流回復の速さと、術後3週間での最終的な血流回復値によって評価した。治療群 (フィブロネクチン単独投与群、BMI群および併用群) とコントロール群の両群は術後3日目より血流の改善が認められ、治療群は術後5日目にコントロール群よりも血流が回復している。術後早期 (術後5日目まで) の血流回復は骨髓細胞を移植された群 (BMI群および併用群) において高く、フィブロネクチン単独投与群は術後早期の評価ではコントロール群と同じ程度の回復に留まっている。この時点では一見単独ではもちろん、BMIとの併用によってもフィブロネクチン投与の効果はないように見える。しかし術後7日目以降、BMI群の回復率はプラトーに達し、逆にフィブロネクチン単独投与群において血流回復率は徐々に上昇し始め、最終的にBMI群とフィブロネクチン単独投与群とで同様の血流比 (0.8前後) となった。フィブロネクチン投与/BMI併用群は術後後期になっても変わらず回復し続け、最終的に患肢/健肢血流比は正常の1.0前後を示した。このことは単独移植された骨髓細胞のほとんどが7日目までにアポトーシスに陥り死滅するとしているこれまでの報告を裏付け、かつ今回併用投与されたフィブロネクチンが何らかの形でBMIの効果を持続・増強させている可能性を示唆する。

さらにフィブロネクチン単独投与群においても一定の血流改善効果が得られたものの、フィブロネクチン単独投与群ではBMI群との併用に比べ十分な血流改善は得られず、血管数、大腿直筋の組織学的変化、いずれをとってもフィブロネクチン単独投与/BMI併用群において最も良好な結果を得た。またBMI群において、術後早期における血流回復が併用群とほぼ同等に観察された一方、フィブロネクチン単独投与群では術後早期の血流回復は認められなかった。このことは移植細胞が、特に移植後早期において何らかの役割を担って

いることを示唆するものであり、骨髄細胞がアポトーシスに陥り移植局所から消滅するまでの間、局所に留まり何らかの刺激作用を発現している可能性も示唆される。

本研究においてBMIの効果発現が術後ごく早期から現れたことは、移植翌日から疼痛の軽減、皮膚温の上昇といった効果がみられるとする臨床報告とも合致しており、血管新生の速度を鑑みても、BMIの効果が、特にごく早期においては血管新生によってのみもたらされるものではないことを支持する結果であった。臨床症例の中でBMIの効果が術後早期のみ一過性に現れ、遠隔期にはその効果が減じたこととされる報告があるが、これらもまた、BMIの効果が炎症性サイトカインを通じて発揮されている可能性を支持する。

フィブロネクチンは、オプソニン作用や線維芽細胞、単球・マクロファージ系細胞の遊走促進作用などの生物活性を通じ、炎症過程での初期の局所反応、損傷部位での有害物質の除去、創傷治癒などと深く関係しており、炎症が発生した場合、血中のフィブロネクチン濃度が変動することが臨床的、基礎的に確認されている。また、炎症性サイトカインであるIL-1 β の刺激によって線維芽細胞からフィブロネクチンが産生されること³⁴や、あるいはIL-1 β がヒト単球のIL-6産生を誘導し、IL-6はさらにフィブロネクチンの産生を誘導することが知られている^{35,36}。術後ごく早期のBMI群における血流増加、後期におけるフィブロネクチン投与群の血流改善は、BMIによって刺激されたIL-1 β 、IL-6といった炎症性サイトカインが、一方で局所の一時的な血流増加をもたらし、フィブロネクチン産生を促すことにより血管新生を惹起している可能性も考えられる。

創傷治癒過程においても、フィブロネクチンは創傷内に強発現し、創部への細胞の遊走を促し創傷治癒を助けると言われており、眼科領域においては自己血液より採取されたフィブロネクチン点眼薬による創傷治癒が試みられている^{37,38}。今回の研究では潰瘍形成をきたすような虚血肢に対しての実験は行ってい

ないが、BMI療法を必要とする患者の多くが難治性潰瘍を合併していることを考えれば、フィブロネクチンを併用投与薬剤として用いるメリットは少なくないかもしれない。また点眼薬といった形であれば、すでに臨床応用されているといった点で安全性が確立しており、また自己血液からの精製手段が確立している点においても、臨床応用可能な治療法である可能性が示唆される。

本研究の限界として、側副血行路の発達がおこりやすいマウスを実験動物に用いたため、コントロールにおいても14日で虚血がある程度改善してしまい治療効果を明らかな差として示しえなかったこと、また短期間での検討しか行っていないことがあげられる。今後、より虚血の強い脱落肢モデルあるいは大動物を用いた検討を加えていく必要がある。

文 献

- 1) Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, et al. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest* 1994; 93:662-70, 1994
- 2) Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, et al. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischemic limb. *Lancet* 10; 348: 370-4, 1996
- 3) Lazarous DF, Unger EF, Epstein SE, Stine A, Arevalo JL, et al. Basic fibroblast growth factor in patients with intermittent claudication: results of a phase I trial. *J Am Coll Cardiol* 36: 1239-44, 2000
- 4) Lederman RJ, Mendelsohn FO, Anderson RD, Saucedo JF, Tenaglia AN, et al. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet* 15; 359: 2053-8, 2002
- 5) Rajagopalan S, Mohler E 3rd, Lederman RJ, Saucedo J, Mendelsohn FO, et al. Regional Angiogenesis With Vascular Endothelial Growth

- Factor trial. Regional Angiogenesis with Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in peripheral arterial disease: Design of the RAVE trial. *Am Heart J* 145:1114-8, 2003
- 6) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, et al. Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science* 14; 275:964-7, 1997
 - 7) Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 5:434-8, 1999
 - 8) Jia L, Takahashi M, Yoshioka T, Morimoto H, Ise H, et al. Therapeutic potential of endothelial progenitor cells for cardiovascular diseases. *Curr Vasc Pharmacol* 4:59-65, 2006
 - 9) 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* 360:427-35, 2002
 - 10) Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 9:1370-6, 2003
 - 11) Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 19; 94:678-85, 2004
 - 12) Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 30; 109:1543-9, 2004
 - 13) Tateno K, Minamino T, Miyauchi H, et al. Application of hematopoietic cells to therapeutic angiogenesis. *Curr Pharm Des* 12:557-63, 2006
 - 14) Suuronen EJ, Veinot JP, Wong S, et al. Tissue-engineered injectable collagen-based matrices for improved cell delivery and vascularization of ischemic tissue using CD133+ progenitors expanded from the peripheral blood. *Circulation* 114(1 Suppl):I138-44, 2006
 - 15) Huang NF, Yu J, Sievers R, Li S, Lee RJ. Injectable biopolymers enhance angiogenesis after myocardial infarction. *Tissue Eng* 11:1860-6, 2005
 - 16) Ryu JH, Kim IK, Cho SW, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells using injectable fibrin matrix enhances neovascularization in infarcted myocardium. *Biomaterials* 26: 319-26, 2005
 - 17) Hynes RO. Fibronectins. New York, NY, Springer-Verlag, 1990
 - 18) Storck J, Del Razek A, Zimmermann ER. Effect of polyvinyl chloride plastic on the growth and physiology of human umbilical vein endothelial cells. *Biomaterials* 17: 1791-4, 1996
 - 19) Ingber DE, Prusty D, Frangioni JV, Cragoe EJ Jr, Lechene C, Schwartz MA. Control of intracellular pH and growth by fibronectin in capillary endothelial cells. *J Cell Biol* 110: 1803-11, 1990
 - 20) Ingber DE. Fibronectin controls capillary endothelial cell growth by modulating cell shape. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 3579-83, 1990
 - 21) Wijelath ES, Rahman S, Namekata M, et al. Heparin-II domain of fibronectin is a vascular endothelial growth factor-binding domain: enhancement of VEGF biological activity by a singular growth factor/matrix protein synergism. *Circ Res* 99: 853-60, 2006
 - 22) Wijelath ES, Rahman S, Murray J, et al. Fibronectin promotes VEGF-induced CD34 cell differentiation into endothelial cells. *J Vasc Surg* 39: 655-60, 2004
 - 23) 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: 3422-7, 2000
 - 24) Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 105: 1527-36, 2000
 - 25) Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T,

- Sasaki K, et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 103: 897-903, 2001
- 26) Wijelath ES, Murray J, Rahman S, et al. Novel vascular endothelial growth factor binding domains of fibronectin enhance vascular endothelial growth factor biological activity. *Circ Res* 91: 25-31, 2002
- 27) Johansson S, Svineng G, Wennerberg K, et al. Fibronectin-integrin interactions. *Front Biosci* 2: 126-46, 1997
- 28) Krzyzanowska-Glab D, Lemanska-Perek A, Katnik-Prastowska I. Fibronectin as an active component of the extracellular matrix. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 61: 655-63, 2007
- 29) Nicosia RF, Bonanno E, Smith M. Fibronectin promotes the elongation of microvessels during angiogenesis in vitro. *J Cell Physiol* 154: 654-61, 1993
- 30) George EL, Georges-Labouesse EN, Patel-King RS, Rayburn H, Hynes RO: Defects in mesoderm, neural tube, and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* 119: 1079, 1993
- 31) Enis DR, Shepherd BR, Wang Y, et al. Induction, differentiation, and remodeling of blood vessels after transplantation of Bcl-2-transduced endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 425-30, 2005
- 32) Links Ingber DE, Prusty D, Frangioni JV, Cragoe EJ Jr, Lechene C, Schwartz. Control of intracellular pH and growth by fibronectin in capillary endothelial cells. *J Cell Biol* 110: 1803-11, 1990
- 33) Tateno K, Minamino T, Toko H, Akazawa H, Shimizu N, et al. Critical Roles of Muscle-Secreted Angiogenic Factors in Therapeutic Neovascularization. *Circ Res* 98: 1194-202, 2006
- 34) Kubo K, Setoguchi K, Matuyama K et al. The Japanese Society of Periodontology. Effects of Lipopolysaccharide from Periodontopathic Bacteria and Interleukin-1 on Fibronectin Synthesis in Cultured Human Fibroblasts The Japanese *Society of Periodontology*. Vol. 34, No. 3 (1992/09/28) pp. 654-664
- 35) Hagiwara T, Suzuki H, Kono I, et al. Regulation of fibronectin synthesis by interleukin-1 and interleukin-6 in rat hepatocytes. *Am J Pathol* 136: 39-47, 1990
- 36) David A. Vesey, Catherine W.Y. Cheung, Leila Cuttle, et al. Interleukin-1 β induces human proximal tubule cell injury, α -smooth muscle actin expression and fibronectin production. *Kidney Int* 62: 31-40, 2002
- 37) Fukuda M, Fullard RJ, Willcox MD, et al. Fibronectin in the tear film. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996 37: 459-67, 1996
- 38) Kimura K : Hattori A, Usui Y, Kitazawa K, et al. Stimulation of corneal epithelial migration by a synthetic peptide (PHSRN) corresponding to the second cell binding site of fibronectin : *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 1110-1118, 2007

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

体外増幅自己赤芽球を用いた血管再生治療に関する研究・
第 I/II 相臨床試験（中間報告）

分担研究者 相澤義房
研究協力者 鳥羽 健、小澤 拓也
新潟大学医歯学総合研究科

研究要旨

【目的】

重症下肢虚血患者に対するBMIによる血管新生療法が行われてきたが、患者への侵襲が大きく治療効果も不十分であった。我々はBMIによる血管新生において、移植骨髄中に含まれる赤芽球とマクロファージが主要な役割を果たしていることを明らかにした。少量の骨髄中に含まれている造血幹細胞を増幅培養することで、血管新生作用に富む赤芽球とマクロファージの混合物を得るための培養条件を決定し、本研究班の平成19年度報告書で示した。この方法を用いて第 I/II 相臨床試験を行った。

【方法と結果】

1. 本臨床試験は新潟大学医学部倫理委員会および新潟大学医歯学総合病院医薬品・医療機器等臨床研究審査委員会（IRB）に申請し承認を得た。また米国に設置の国際治験登録センター（ISRCTN）に登録を行った。
2. これまでに5例の非ASO患者を登録した。
3. 患者から局所麻酔下に採取した約20 ccの骨髄を当施設に設置のGMPグレード細胞プロセッシング室（CPR）に搬入し、骨髄単核細胞をrhFlt-3L・rhSCF・rhTPOの存在下で7日間培養し、その後rhEPO・rhSCF・rhIGF-1の存在下で7日間の培養を行う2段階の培養法を行い、ヘモグロビン合成開始前後の未熟赤芽球とマクロファージの混合細胞浮遊液を得た。
4. 細胞を十分に洗浄したのち、50 ccの日赤血小板濃厚液に再浮遊し、CPRから出荷し、患者の虚血肢に筋肉内投与した。
5. 5例の全例で4週間以内に臨床症状および検査値の改善が得られた。

【展望】

従来法のBMIは術前TcO₂が30 mmHg以下の再重症例には無効であったが、本研究に登録された再重症例の2例にも十分な効果が得られた。今後は他大学・施設からの患者登録を受け付け、当施設のCPRで体外増幅自己赤芽球培養を行い、各施設に出荷する予定である。

緒言

血管再生治療法の中で現在最も広く行われているものは、自家骨髄細胞移植療法（BMI）である¹。当施設ではこれまでにBMIを40例以上

に施行した。BMIは8割以上の患者に有効であるものの、症例の中には治療後も血流量の改善が小さく、臨床的治療効果およびQOLの改善が十分でない例が少なからず存在することが明

らかとなってきた。

BMIによる血管再生の機序は、骨髄中に存在する血管内皮前駆細胞が移植部位で血管再生を起こすものと想像されていたが²、実際にはほとんどが局所に既存する血管からの発芽・伸長によって賄われる血管新生に由来することがわかった³。我々は一連の研究をおこない、BMIによって移植される赤芽球と骨髄マクロファージが、恒常的に骨髄で行われている血管新生を髄外でミミックしていることを明らかにした⁴。

BMI治療では全身麻酔下に大量の骨髄を採取するなど患者自身への侵襲が大きいこと、真に治療を必要とする重症下肢虚血患者に対する効果が不十分であることなど多くの問題が存在し⁵、より洗練された治療法の開発が望まれた。骨髄には造血幹細胞や前駆細胞が含まれ、少量の骨髄から体外増幅培養によって強い血管新生能力を有する赤芽球とマクロファージの浮遊液を得る方法を開発すれば、新たな治療法となりうると考えた。

そこでまず、正常ヒト骨髄を用いて各分化段階の赤芽球を精製分離し、血管増殖因子であるVEGF・PLGF・PDGF・FGF-2・HGF・Ang-1の発現量を解析したところ、ヘモグロビン合成開始前後の未熟赤芽球が最もさかんに血管増殖因子を発現していることがわかり、この分化段階の赤芽球を体外で増幅することを培養法樹立の目的とした。

正常ヒト骨髄単核細胞を用いた培養により、ヘモグロビン合成開始前後の未熟赤芽球を最も効率よく収穫する方法を検討した。その結果、骨髄単核細胞をrhFlt-3L・rhSCF・rhTPOの存在下で7日間培養し、その後rhEPO・rhSCF・rhIGF-1の存在下で7日間の培養を行う2段階の培養法を行うことで、目的とする細胞を最も効率よく収穫することができた。また、培養に用いる細胞を骨髄単核細胞とした場合と、精製CD34陽性細胞とした場合で、差がなかった。

C57/BLマウスのお尻虚血モデル治療実験を行った。マウス骨髄から得られた 1×10^6 個の体外増幅赤芽球を移植したところ、著明な血管新生効果が得られ、その効果は10倍数 (1×10^7 個)

の骨髄細胞移植に匹敵した。

これら一連の結果をもとに、第 I/II 相臨床試験を計画した。

方法と結果

臨床試験計画の策定と審査

多施設共同研究TACT：「骨髄細胞移植を用いた末梢性血管疾患の治療」に準じ、対象患者・評価スケジュール等を定めた「慢性重症虚血下肢患者を対象とした体外増幅自己赤芽球を用いた血管再生治療に関する研究・第 I/II 相臨床試験 (EVEETA study)」の実施計画書を作成し、新潟大学医学部倫理委員会および新潟大学歯学総合病院医薬品・医療機器等臨床研究審査委員会に審査の請求を行い、両者からの承認を得た。これをもとに米国に設置の国際治験登録センター (ISRCTN) に治験の登録を行った。

試験培養の実施

培養手順書、安全性試験手順書等の必要書類を作成し審査を受け承認された。5名の健康人男性から説明と同意ののちに骨髄を採取し、培養プロトコルに完全に従った方法による試験培養を行い、培養プロトコルの効率・有効性および安全性の検討を行った。

骨髄単核細胞から培養を開始し、細胞数で約10倍、赤芽球の絶対数で約30倍、目的とする前赤芽球 (ヘモグロビン合成開始前後の未熟赤芽球) の絶対数で約500倍の増幅効率である細胞浮遊液 (未熟赤芽球60%前後、マクロファージ10%前後、その他未熟骨髄系細胞30%前後) が得られた。この結果から臨床試験の本培養で患者から採取する骨髄量を試算し、患者年齢を2で割った値 (ml) が適当であると判断した。

本培養においては病原体に関して安全であるとされる豪州産のウシ血清を用いたが、製品出荷時の試薬残留の程度を調べる目的で、高感度ELISA法によるウシ血清アルブミンの測定を行った。FBSの残留率は0.1 ppm程度であり、十分に洗浄除去されていた。

出荷サンプルを用いて、エンドトキシン濃度の測定、マイコプラズマ抗原の測定、好気性