

菌・嫌気性菌等の培養試験などを行った結果、培養工程での菌混入が皆無であることが確認された。

これらの結果を提出し、本培養の承認を受けた。

患者の登録と臨床効果および安全性

登録した5例の内訳を表1に示す。また、患者の疼痛の程度（VAS）および患肢の酸素分圧について移植前と移植4週間後の測定値を図1に示す。

表1 症例

Case 1	44F	TAO
Case 2	58F	SSc
Case 3	65M	TAO
Case 4	77M	TAO
Case 5	29F	SLE

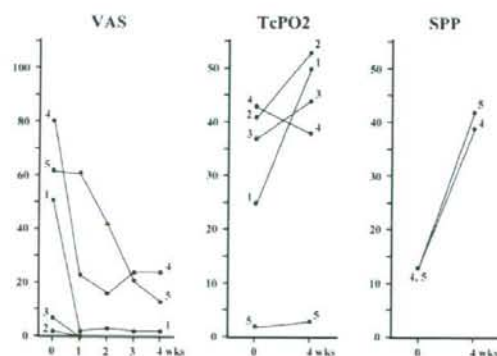


図1

全例でVASの低下が認められた。症例1～3でTcPO2の改善を認めた。また、症例4および5ではTcPO2の改善が明らかでなかったが、より末梢の血流を反映するSPP値では著明な改善が見られた。

考察

本EVEETA法では全身麻酔による骨髄採取が不要で患者への侵襲が低い。また、これまで行ってきたBMIによる血管再生治療では、TcPO2が30未満の最重症例に対する有効性が低かった

が、EVEETA法による治療では最重症例に対しても有効であった。

今回解析した5例は平成21年5月で移植1年を経過するので、非ASO患者に対するBMIの治療効果との詳しい比較解析が可能となる。

今後さらに当施設での登録症例を増やすと同時に、他の施設からも患者を受け入れ、EVEETA法のBMI法に対する優越性の根拠を示す必要がある。

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, Schattman 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.

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

研究協力者 井畑 淳、上田敦久、大野 滋*、岳野光洋
横浜市立大学大学院医学研究科病態免疫制御内科
横浜市立大学附属総合医療センター病院*

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 8 症例での有効性を報告している。これまでは治療後の比較を行う目的で単肢のみに血管新生療法を施行していたが、今回は複数肢への治療を試みた。骨髓血採取においては骨髓採取ガイドラインに従い、浮遊液を RPMI から生理食塩水に変更をおこない、細胞の viability を検討した。

また、骨髓単核球分離に使用していた機器を変更し、麻酔時間及び分離時間の短縮を試みた。

方法としては、腸骨より骨髓液を約 400-900 ml 採取し、単核球 $1\sim 3 \times 10^9$ cells を分離精製後、虚血肢骨格筋内に投与した。

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。

緒言

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、長期予後について継続して検討し、更に複数肢への治療の忍容性および機器変更による麻酔時間・分離時間の短縮について検討した。



図1 変更した血球分離装置

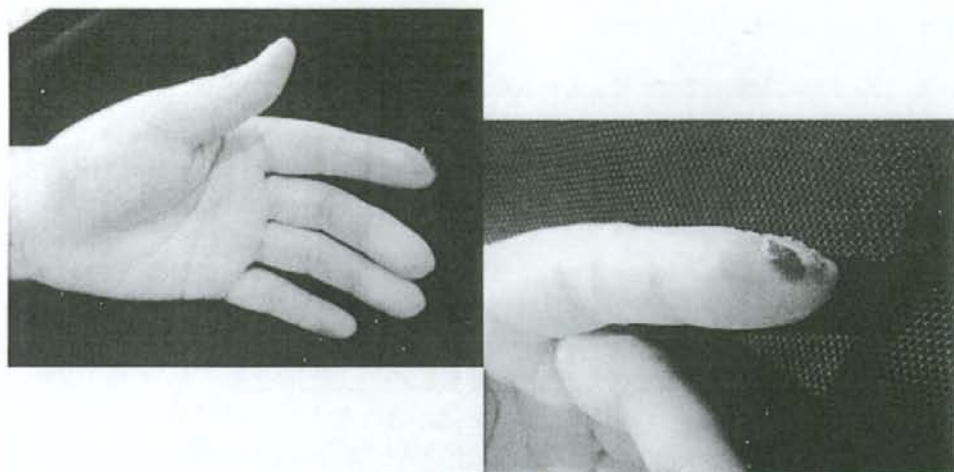
血球分離装置を従来の Cobe Spectra から Fresenius COM.TEC (Fresenius Hemocare 社) へ変更

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。今回新しく血管新生療法を行った3例について以下に病歴を記す。



治療前



4週後

図2 症例9

症例9

31歳、女性。1995年夏、眼の乾燥症状出現、広島市の病院でシェーグレン症候群と診断。2005年2月、混合性結合組織病の診断（日光過敏+多発関節炎+筋力低下等症状あり）。2007年秋、第2指の冷感・蒼白を自覚、徐々に潰瘍となった

（図2）。2008年1月、近医に入院。シロスタゾール・PGE1製剤点滴・アルガトロバン・プロスタグランジン外用加療を受けたが改善せず徐々に悪化。2008年2月14日外来紹介受診。2008年3月3日血管新生目的で入院となる。



治療前



8週後



16週後

図3 症例10

症例10

53歳、女性。2000年 SLE と診断。腎生検にて WHO II 型であった。2002年左下腿潰瘍で皮膚科入院。PSL 6 mg まで減量。その後も皮膚潰瘍繰り返し、2003年 SLE の再燃のため PSL 30 mg とした。2006年腰痛、発熱が出現し、化膿性脊

椎炎で入院。2007年肺炎のため入院。その後も下腿潰瘍は治癒・再燃を繰り返していた（図3）。2008年6月24日血管新生療法目的にて当院当科入院となった。



図4 症例11

症例11

61歳、女性。1974年発症のSLE。(蝶形紅斑、多発関節炎、白血球減少、リンパ球減少、抗核抗体陽性)リンデロン加療し寛解に至り、漸減中止。1992年、左足趾にチアノーゼ、潰瘍形成し切断。その後第1足趾に潰瘍形成を繰り返していた。2004年、カルジオリピン抗体陽性となり、抗リン脂質抗体症候群と考えられた。2006年9月14日左第1趾潰瘍改善なく、当科紹介受診。12月6日、左足に血管新生療法施行。同部位潰瘍は改善。2008年 左第1趾、左第4指、右第3指に皮膚潰瘍出現(図4)。再度血管新生療法行う方針となり、9月12日入院となった。

＜術前検査＞

術前スクリーニング検査として、血液検査、尿検査、便潜血検査、胸部および腹部X線写真撮影、心エコー、胸部および腹部CT検査、頭部MRI検査等を行い、全身麻酔に伴うリスクを評価するとともに、除外対象となる虚血心疾患、脳血管障害、糖尿病性網膜症、悪性新生物等を

検索した。また、今回は多肢への投与を検討したため、血管新生療法3週間前に自己血の保存を行った。

＜手術方法＞

全身麻酔下(1例は、肺線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400~700mlの骨髓液を、採取。採取予定量が500ml以上の症例においてはあらかじめ自己血を準備し、200mlの輸血を行った。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、Fresenius COM.TEC血液成分分離装置(Fresenius Hemocare)を用いた密度勾配遠心分離により(図1)骨髓単核球を分離後、25-50mlの細胞浮遊液に調整した。このうち20-45mlを移植用検体とし、1mlシリンジ40-90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clone 581 (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。

結果

<各症例の臨床的特徴>

今回の検討事項の比較のため、我々が新たに血管新生療法を行った3例と今回までに経験した8例をあわせて提示する。

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、全身性エリテマトーデス4例及び混合性結合組織病1例であり、年齢は32~72歳、全て女性であった。罹病期間は5~35年であつ

た。(表1、2)

<骨髄細胞数およびCD34陽性率の解析>

表3,4に示すように採取した骨髄液量および骨髄単核球細胞数は、それぞれ 482 ± 34.3 mlおよび $25.83 \pm 7.86 \times 10^9$ cellsであった。移植した生細胞数は $1.57 \pm 0.27 \times 10^9$ cellsであり、このうちCD34陽性細胞は、 $3.14 \pm 0.63 \times 10^7$ cellsであった。血球分離装置変更前後で比較すると分離時間はそれぞれ 201 ± 9.0 分、 120 ± 12.0 分であり、分離に使用した自己血は400 ml, 200 ml。分離後の生細胞数は $1.63 \pm 0.33 \times 10^9$ cells, $1.39 \pm 0.53 \times 10^9$ cellsであり、移植されたCD34陽性細胞数は $3.66 \pm 0.78 \times 10^7$ cells, $1.75 \pm 0.44 \times 10^7$ cellsであった(表7)。

<移植後の臨床経過について>

移植後の経過観察期間中(3ヶ月~5年3ヶ月)、移植前に認めた皮膚潰瘍は10例で上皮化、1例が表皮欠損にまで治癒した(表5、6)。今回血管新生療法を施行した3症例の皮膚潰瘍の大きさの変化を図2-4に示す。症例11に関しては、血管新生療法12週後の皮膚潰瘍は表皮欠損の状態までの治癒にとどまった。

表1. 各症例の臨床的特徴 (1)

	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)	21	5	19	22	5	19	33	14
自覚症状								
Raynaud現象	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
m-Rodnan TSS (0-51)	27	8	32	9	18	32	10	15
SHAQ (0-60)	0	6	30	13	2	40	10	15
臓器合併症								
cardio-pulmonary	(-)	(-)	(-)	(-)	IP	(-)	(-)	(-)
gastro-intestinal	GERD	(-)	GERD/PBC	(-)	GERD	GERD/PBC	(-)	(-)
自己抗体								
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
血管新生までの治療法								
PSL	(-)	(-)	5mg / day	(-)	8mg / day	(-)	(-)	15mg / day
prostaglandin	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

表 2. 各症例の臨床的特徴 (2)

	症例 9	症例 10	症例 11	総計
年齢 (yr) / 性別	30 / F	54 / F	61 / F	54.5 ± 3.9
罹病期間 (yr)	14	10	35	18.0 ± 3.0
自覚症状				
Raynaud現象	(-)	(+)	(+)	10/11
m-Rodnan TSS (0-51)				
SHAQ (0-60)	0	6	12	11.6 ± 3.9
臓器合併症				
cardio-pulmonary	(-)	IP	(-)	IP 2
gastro-intestinal	(-)	(-)	(-)	GERD 4
自己抗体				
ANA	1280 sp	640 sp	1280 sp	
anti-centromere	<7.0	<7.0	<7.0	5/11
anti-Scl 70	< 7.0	< 7.0	< 7.0	2/11
anti-RNP	6320	151	2680	5/11
血管新生までの治療法				
PSL	7mg/day	18mg/day	(-)	6/11
prostaglandin	(+)	(+)	(-)	9/11

表 3. 採取骨髓液中の CD34 陽性細胞数および移植した細胞数 (1)

	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 ⁺ 細胞 / μL (%)	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 ⁺ 生細胞数(10^7 cells)	7.58	0.46	3.94	4.42	3.01	2.53	1.89	5.44

表 4. 採取骨髓液中の CD34 陽性細胞数および移植した細胞数 (2)

	症例 9	症例 10	症例 11	総計
採取骨髓液量 (ml)	535	510	770	482 ± 34.3
骨髓単核球細胞数 (10 ⁴ /μL)	3.96	9.81	3.06	5.36 ± 1.63
CD34 ⁺ 細胞 /μL (%)	765 (2.61)	405 (0.47)	575 (2.16)	1687.8 ± 311.6 (2.16 ± 0.32)
移植された単核球 生細胞数(10 ⁶ cells)	0.59	2.40	1.18	1.57 ± 0.27
移植されたCD34 ⁺ 生細胞数(10 ⁷ cells)	1.53	1.12	2.59	3.14 ± 0.63

表 5. 治療経過のまとめ (1)

	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)	63	34	18	45	31	27	14	24
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 ₁ の使用	あり	あり	あり	あり	なし	なし	なし	なし
移植肢への 皮膚潰瘍の再発	なし	なし ^{*1}	あり ^{*2}	なし	なし	なし	あり	なし

*1 対側肢に潰瘍が出現した。

*2 IA-DSAでは再発した潰瘍は塞栓による可能性が示唆された。

表 6. 治療経過のまとめ (2)

	症例 9	症例 10	症例 11	総計
フォローアップ期間(月)	9	6	3	29 ± 5.5
皮膚潰瘍の転帰	上皮化	上皮化	表皮欠損	
有害事象	発熱	なし	発熱	
レイノー現象の出現	あり	あり	あり	
LipoPGE ₁ の使用	あり	あり	あり	8/11
皮膚潰瘍の再発	あり ^{*1}	なし	なし	3/11

*1 再発した潰瘍は表皮欠損にとどまる浅いものであった。

表 7. 自家骨髄採取におけるまとめ

	8症例のまとめ	症例 9-11
麻酔時間(分)	316±10.0	260±27.0
手術時間(分)	264±8.0	200±28.0
採取時間(分)	40±0	57±13
採取骨髄液量 (ml)	436±21.4	605±82.8
骨髄単核球細胞数 (10 ⁴ /μL)	5.27±2.2	5.61±2.12
.....		
分離時間(分)	201±9.0	120±12.0
分離に使用した自己血(ml)	400	200
CD34 ⁺ 細胞 /μL (CD34 ⁺ 細胞 %)	2102±315 (2.31±0.38)	581±103 (1.75±0.65)
移植された単核球 生細胞数(10 ⁹ cells)	1.63±0.33	1.39±0.53
移植されたCD34 ⁺ 生細胞数(10 ⁷ cells)	3.66±0.78	1.75±0.44
.....		
移植時間(分)	23.0±5.0	23±3.0

<有害事象について>

表5、6に示すとおり、手術直後に眩暈、咽頭痛、悪心がそれぞれ一症例ずつ認められ、発熱が3症例に認められたが、いずれも一過性であり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。

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、全身性エリテマトーデス4症例および混合性結合組織病1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。

今回新たに治療を行った3症例に関しては、血球分離装置を従来のCobeSpectraからFresenius COM.TEC (Fresenius Hemocare社)へ変更している(図1)。新しく使用したFresenius COM.TECは血液悪性腫瘍領域において骨髄移植を行う際に標準的に使用される機器のひとつであり、安全性に関してはとくに問題は報告されていない。この機器は血球分離の際に最初に

血漿を指定量分離することによって、全体の容量を減少させ、その結果として分離時間を短くすることが可能となっている。今回の3症例に関しては採取骨髄液量が増加しており、採取時間も延長しているにもかかわらず分離時間は大幅に短縮しており、分離に使用された自己血量も減少していた(表7)。その結果として手技全体に関わる麻酔時間も短縮することが可能となり、患者に与える侵襲をより低くすることができたものと考えられた。また、骨髄血採取過程において以前に使用していたRPMIを骨髄移植ガイドラインに準じて生理食塩水に変更した。これらの変更を行ったにもかかわらず、分離後の生細胞数に関しては大きな変化を認めなかった。移植されたCD34陽性細胞数については減少を認めているが、これは各々の症例によって細胞数にばらつきが認められること(表3、4)、今回行った症例の基礎疾患が異なることが理由のひとつであると考えられた(表1、2)。複数回血管新生療法を施行した症例において、CD34陽性細胞数および生細胞数が低下する傾向が認められたが、治療経過には特に問題は認

められず、これについては今後注意深く検討を行って行く予定である。

また、今までは術後の差をみるために単肢に行っていた血管新生療法を今回多肢に施行した。症例10,11はいずれも多肢に血管新生療法を行ったが(図3, 4)、治療経過は良好であり重篤な合併症も認められていない(表2)、採取骨髄液量の増加も自己血の貯蔵によって十分解決可能であると考えられ(表4)、血管新生療法は多肢に施行可能であろうと考えられた。

結語

全身性強皮症および全身性エリテマトーデスなどの膠原病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、多肢に施行しても安全性、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。

文献

- 1) Takase K, Ohno S, Ideguchi H, Murakami S, Takeno M, Ishigatsubo Y. Mycobacterium tuberculosis-specific immunospot assay of pleural exudate mononuclear cells is useful for the exclusion of tuberculous pleuritis in patients with lupus pleuritis. *Lupus* 18:175-177, 2009
- 2) Ideguchi H, Ohno S, Takase K, Tsukahara T, Kaneko T, Ishigatsubo Y. A case of Poncet's disease (tuberculous rheumatism). *Rheumatol Int* 2008
- 3) Koharazawa H, Kanamori H, Sakai R, Hashimoto C, Takemura S, Hattori M, Taguchi J, Fujimaki K, Tomita N, Fujita H, Fujisawa S, Harano H, Ogawa K, Motomura S, Maruta A, Ishigatsubo Y. Long-term outcome of L86 and L97 protocols for adult acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 49: 2133-2140, 2008
- 4) Naganawa S, Yokoyama M, Shiino T, Suzuki T, Ishigatsubo Y, Ueda A, Shirai A, Takeno M, Hayakawa S, Sato S, Tochikubo O, Kiyoura S, Sawada K, Ikegami T, Kanda T, Kitamura K, Sato H. Net positive charge of HIV-1 CRF01_AE V3 sequence regulates viral sensitivity to humoral immunity. *PLoS ONE* 3:e3206, 2008
- 5) Suda A, Nagaoka S, Ohono S, Ideguchi H, Soga T, Ishigatsubo Y. The efficacy and safety of bucillamine as a second-line DMARD in the treatment of rheumatoid arthritis: a retrospective cohort study. *Mod Rheumatol* 18:609-614, 2008
- 6) Kirino M, Kirino Y, Takeno M, Nagashima Y, Takahashi K, Kobayashi M, Murakami S, Hirasawa T, Ueda A, Aihara M, Ikezawa Z, Ishigatsubo Y. Heme oxygenase 1 attenuates the development of atopic dermatitis-like lesions in mice: implications for human disease. *J Allergy Clin Immunol* 122: 290-297, 2008
- 7) Fujita A, Tomita N, Fujita H, Motohashi K, Hyo R, Yamazaki E, Hattori M, Fujisawa S, Kanamori H, Ogawa K, Motomura S, Kodama F, Ishigatsubo Y. Features of primary extranodal lymphoma in Kanagawa, a human T-cell leukemia virus type 1 nonendemic area in Japan. *Med Oncol* 2008
- 8) Ideguchi H, Ohno S, Takase K, Ueda A, Ishigatsubo Y. Outcomes after switching from one bisphosphonate to another in 146 patients at a single university hospital. *Osteoporos Int* 19: 1777-1783, 2008
- 9) Murakami S, Takeno M, Oka H, Ueda A, Kurokawa T, Kuroiwa Y, Ishigatsubo Y. Diagnosis of tuberculous meningitis due to detection of ESAT-6-specific gamma interferon production in cerebrospinal fluid enzyme-linked immunospot assay. *Clin Vaccine Immunol* 15:897-899, 2008
- 10) Fujimaki K, Tanaka M, Takasaki H, Hyo R, Kawano T, Sakai R, Fujita H, Fujisawa S, Kanamori H, Maruta A, Ishigatsubo Y. Thiotepa/cyclophosphamide/TBI as a conditioning regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients aged 50 years and over. *Intern Med* 47:379-383, 2008
- 11) Kirino Y, Takeno M, Watanabe R, Murakami S,

- Kobayashi M, Ideguchi H, Ihata A, Ohno S, Ueda A, Mizuki N, Ishigatsubo Y. Association of reduced heme oxygenase-1 with excessive Toll-like receptor 4 expression in peripheral blood mononuclear cells in Behcet's disease. *Arthritis Res Ther* 10: R16, 2008
- 12) Ideguchi H, Ohno S, Takase K, Hattori H, Kirino Y, Takeno M, Ishigatsubo Y. Successful treatment of refractory lupus-associated haemophagocytic lymphohistiocytosis with infliximab. *Rheumatology* 46:1621-1622, 2007
- 13) Inoue S, Oshiro H, Watanuki Y, Miyazawa N, Kudo M, Goto H, Tsukiji J, Kaneko T, Ishigatsubo Y. Metastatic brain mass caused by slow-growing small-cell lung cancer: differential vascular endothelial growth factor expression in primary and metastatic tumor. *Clin Lung Cancer* 8:436-438, 2007
- 14) Miyazaki T, Fujimaki K, Shirasugi Y, Yoshida F, Ohsaka M, Miyazaki K, Yamazaki E, Sakai R, Tamaru J, Kishi K, Kanamori H, Higashihara M, Hotta T, Ishigatsubo Y. Remission of lymphoma after withdrawal of methotrexate in rheumatoid arthritis: relationship with type of latent Epstein-Barr virus infection. *Am J Hematol* 82:1106-1109, 2007
- 15) Ideguchi H, Ohno S, Hattori H, Ishigatsubo Y. Persistence with bisphosphonate therapy including treatment courses with multiple sequential bisphosphonates in the real world. *Osteoporos Int* 18:1421-1427., 2007
- 16) Ishizawa J, Fujita H, Iguchi M, Tachibana T, Taguchi J, Ishigatsubo Y. Quantification of circulating varicella-zoster virus DNA for follow-up in a case of visceral varicella-zoster infection ameliorated with intravenous acyclovir. *Int J Hematol* 85: 242-245, 2007
- 17) Kobayashi N, Yang J, Ueda A, Suzuki T, Tomaru K, Takeno M, Okuda K, Ishigatsubo Y. RanBPM, Muskelin, p48EMLP, p44CTLH, and the armadillo-repeat proteins ARMC8alpha and ARMC8beta are components of the CTLH complex. *Gene* 396:236-247, 2007
- 18) Okamura M, Yamaji S, Nagashima Y, Nishikawa M, Yoshimoto N, Kido Y, Iemoto Y, Aoki I, Ishigatsubo Y. Prognostic value of integrin beta1-ILK-pAkt signaling pathway in non-small cell lung cancer. *Hum Pathol* 38: 1081-1091, 2007
- 19) Ideguchi H, Ohno S, Ishigatsubo Y. Risk factors associated with the cumulative survival of low-dose methotrexate in 273 Japanese patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol* 13:73-8, 2007
- 20) Tomita N, Motomura S, Hyo R, Takasaki H, Takemura S, Taguchi J, Fujisawa S, Ogawa K, Ishigatsubo Y, Takeuchi K. Comparison of peripheral T-cell lymphomas and diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer* 109:1146-1151, 2007
- 21) Ideguchi H, Ohno S, Ueda A, Ishigatsubo Y. Catastrophic antiphospholipid syndrome associated with malignancies. *Lupus* 16: 59-64, 2007
- 22) Kirino Y, Takeno M, Murakami S, Kobayashi M, Kobayashi H, Miura K, Ideguchi H, Ohno S, Ueda A, Ishigatsubo Y. Tumor necrosis factor alpha acceleration of inflammatory responses by down-regulating heme oxygenase 1 in human peripheral monocytes. *Arthritis Rheum* 56:464-475, 2007
- 23) Ideguchi H, Ohno S, Ishigatsubo Y. A case of pure red cell aplasia and systemic lupus erythematosus caused by human parvovirus B19 infection. *Rheumatol Int* 27:411-414, 2007
- 24) 井畑 淳、石ヶ坪良明. 関節超音波検査における滑膜炎スコアリング. *リウマチ科* 38:7-12, 2007
- 25) 岳野光洋、村上修司、石ヶ坪良明. TNF 阻害薬の臨床:我が国における臨床成績を中心に. *日本臨床* 65:1308-1313, 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

膠原病・アレルギー疾患による難治性潰瘍・壊疽に対する 自己骨髄幹細胞による血管新生療法の有効性

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

研究要旨

現行の内科的及び外科的治療で治癒しない（no optional patients）、膠原病・アレルギー疾患による重症虚血上・下肢 22 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確認した。また術前予後予測因子として心筋血流製剤である ^{99m}Tc -TF、さらに $100\% \text{O}_2$ 吸入下経皮酸素分圧測定（ TcPO_2 ）測定による新しい予後予測法を開発した。前医で患肢大切断或いは治療がないと診断されたバージャー病、膠原病・アレルギー疾患症例 22 例中20例（91.0%）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。自己骨髄幹細胞による血管新生療法は、limb salvage のための新しい戦略となりうると考えられた。

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）治療抵抗性虚血上・下肢（バージャー病、膠原病・アレルギー疾患）に対する自己骨髄幹細胞移植による血管再生療法の有効性、安全性を証明する。

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 μl 及び200 μl 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 シリンジで虚血上・下肢に筋注した。

（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 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。

研究結果

Fontaine 分類では、100%がIV度（22/22例）を占めた。視覚的アナログ（visual analog scale: VAS）にて定量的に検討したが、術前 81.3 ± 17.2 (mm)に対して術後 4 週で 10.8 ± 7.6 (mm)と著明に低下していた（ $p < 0.0001$ ）さらにASO症例を入れた下肢症例のみの検討では、自立歩行による退院（有効群）15例と、膝下切断（無効群）4例での検討では、ABIには有意差はなく、 ^{99m}Tc Technecium tetrofosmin (^{99m}Tc -TF) perfusion scintigraphy検査においては、 0.90 ± 0.34 vs. 0.42 ± 0.14 , $p < 0.02$ で有効例で優り、Transcutaneous oxygen tension (TcPO_2)は、 $100\% \text{O}_2$ 吸入において 41.9 ± 24.3 mmHg vs. 11.8 ± 14.4 mmHg $p < 0.05$ と $100\% \text{O}_2$ 吸入試験の有効性が明らかとなった。

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、22例中 2例で後 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。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。BMI術前と比較した術後4週における 99mTc-TF 血流シンチグラフィ, 100%O₂吸入TcPO₂ 検査は, 自己骨髄幹細胞による血管新生療法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。

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上・下肢 (バージャー病, 膠原病) に対する自己骨髄幹細胞移植による血管新生療法を22例実施し, その有効性及び安全性を示した。99mTc-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。

健康危険情報 本療法の副作用は認めなかった。

研究発表

1. 論文発表

- 1) Aimoto T, Uchida E, Matsushita A. 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
- 2) Arakawa M, Yasutake M, Miyamoto M, 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
- 3) Tara S, Miyamoto M, Asoh S, et al. Transduction of the anti-apoptotic PTD-FNK protein improves the efficiency of transplantation of bone marrow mononuclear cells. *J Mol Cell Cardiol* 42, 489-497, 2007
- 4) Shirakabe A, Tano H, Nakamura S, Kikuchi A, Sasaki A, Yamamoto E, Kawashima S, Takagi G, Fujita N, Aoki S, Asai K, Yoshikawa M, Kato K, Yamamoto T, Takayama M, Takano T. Coronary Perforation During Percutaneous Coronary Intervention: Lessons From Our Experiences. *Int*

Heart J 48:1-9, 2007

- 5) 宮本正章, 高木 元, 太良 修平 他. Nursing Lecture(43)マゴットセラピー;そのメリット, ケアの実際. *月刊ナーシング* 27: 78~85, 2007
 - 6) 高木 元, 宮本正章, 水野杏一. 糖尿病性潰瘍・壊疽. *看護技術* 54. 121-123. 2008,
 - 7) 高木 元, 水野杏一. [総説] 血管内皮機能と血栓症の臨床的評価. *The Circulation Frontier* 11: No 4, 2008.
 - 8) 宮本正章, 高木 元, 高野仁司, 川中秀和, 大坪春美, 水野博司, 田端泰彦, 水野杏一. [総説] 皮膚組織の再生医療. *MSD* 34, 25-28, 2008
 - 9) 宮本正章, 高木 元, 高野仁司, 川中秀和, 大坪春美, 水野博司, 松田範子, 秋丸琥甫, 徳永 昭, 高橋将文, 池田宇一, 水野杏一. 膠原病による難治性皮膚潰瘍とその対策. *リウマチ科* 39, 2, 149-155
 - 10) 宮本正章, 水野杏一: 治療抵抗性壊疽に対するマゴットセラピー. *皮膚病診療* 30: 1051-1060, 2008
 - 11) 宮本正章, 高木 元, 水野博司ほか: 重症糖尿病性足壊疽におけるマゴットセラピーの有効性. *Diabetes Frontier* 19: 331~339, 2008
- ### 2. 著書
1. 高木 元, 宮本正章, 水野杏一. [分担] 幹細胞移植: 透析患者の末梢動脈疾患とフットケア108-114, 2008. 2月, 小林修三編, 医薬ジャーナル社
 2. 宮本正章, 高木 元, 水野杏一. [分担] マゴットセラピー: 透析患者の末梢動脈疾患とフットケア115-125, 2008. 2月, 小林修三編, 医薬ジャーナル社
 3. 宮本正章: 糖尿病性壊疽に対するマゴットセラピー日本臨牀 増刊号 新時代の糖尿病学, 700-712, 2008河盛隆造編, 日本臨床社
- ### 3. 学会発表
- 1) 宮本正章 マゴットセラピー 第60回日本衛生動物学会東日本支部総会 特別講演 2008.10
 - 2) 宮本正章 治療抵抗性末梢動脈疾患に対する再生医療を応用した先進併用療法 東総動脈硬化研究会 特別講演 2008.5.

知的財産権の出願・登録状況 なし

1. 実用新案登録 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療法の多施設共同研究

分担研究者 藤本和輝
研究協力者 宮尾雄治、古賀英信、中田恵実、金澤尚徳
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11例（バージャー病8例、膠原病3例（結節性多発性動脈炎2例、強皮症1例）、25肢、男性6例、女性5例、平均年齢52.0±15.9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: バージェア病の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。その後、再度、血管再生療法を施行し完全に良くなった。今回、その後の治療も継続し維持できている。
- 4: その他の症例は、平均約33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11例（バージャー病 8 例、膠原病 3 例（結節性多発性動脈炎 2 例、強皮症 1 例）、25肢、男性 6 例、女性 5 例、平均年齢52.0±15.9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
11	女性	40	バージャー病	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。

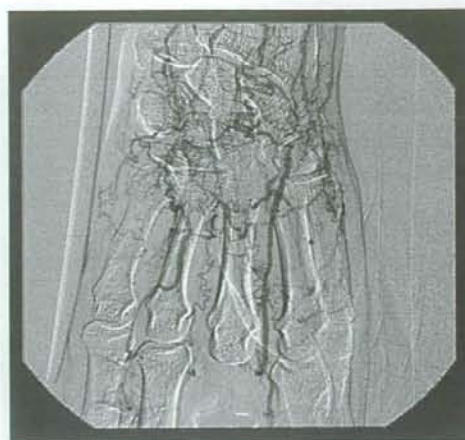
壊疽を認めた 4 例は、壊疽部の切断を行ったが、壊疽部の切断のみで完全に傷治癒した。

症例 8 は、血管再生療法で完全に良くなった

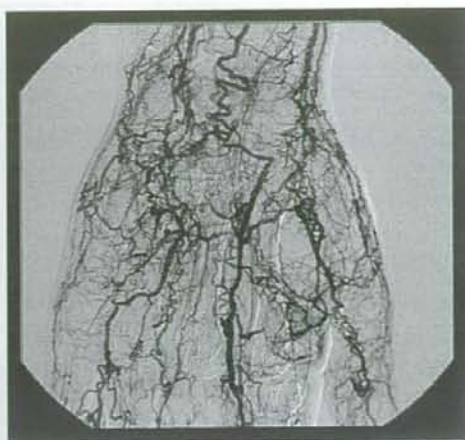
が、再度、悪化した。ただし、血管再生療法後、一切の治療を自己中止し、喫煙も再開していた。その後、再度、血管再生療法を施行し完全に良くなった（症例11）。今回、その後の治療も継続し維持できている（表2）。

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	傷治癒、自覚症状消失
11	女性	40	バージャー病	右下肢	自覚症状消失



治療前



治療後

図1 バージャー病 (症例1)



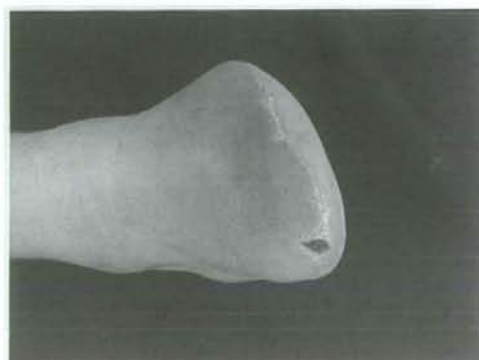
入院時



治療前

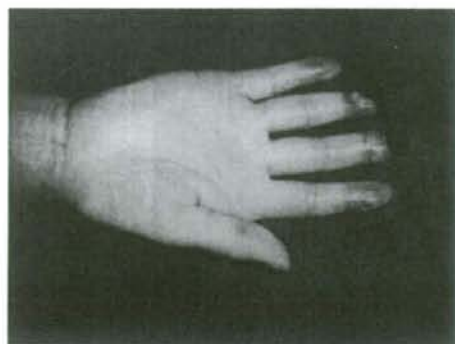


6ヶ月後



1年後

図2 結節性多発動脈炎 (症例2)



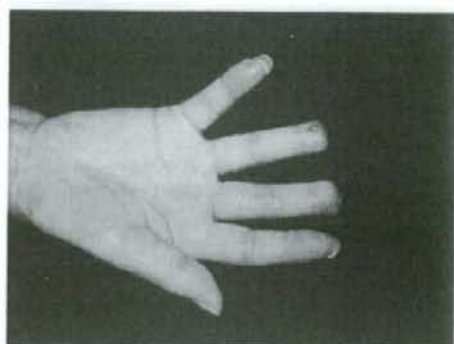
治療前



1週間後



2週間後



3週間後



2ヶ月後

図2 結節性多発動脈炎 (症例10)



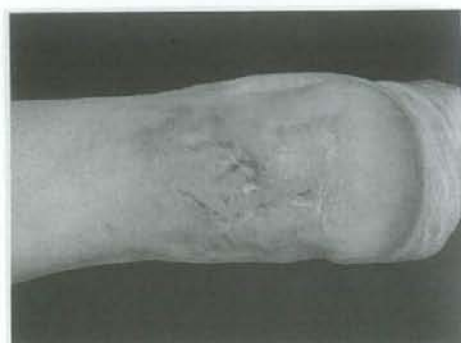
治療前



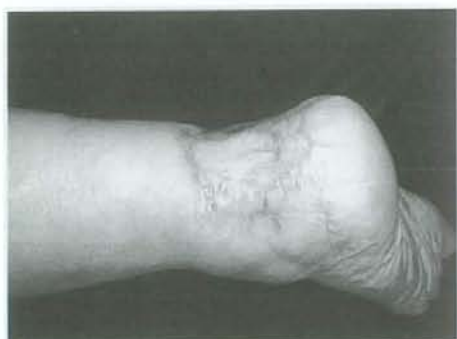
1ヶ月後



2ヶ月後



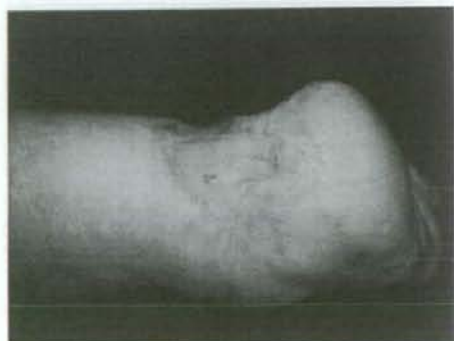
3ヶ月後



6ヶ月後



1年後

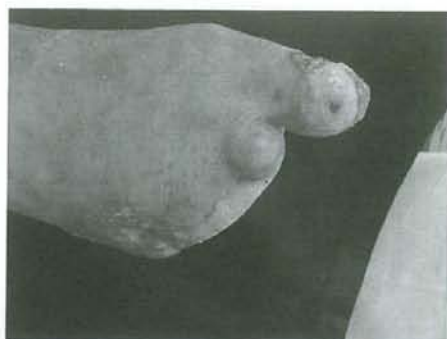


2年後

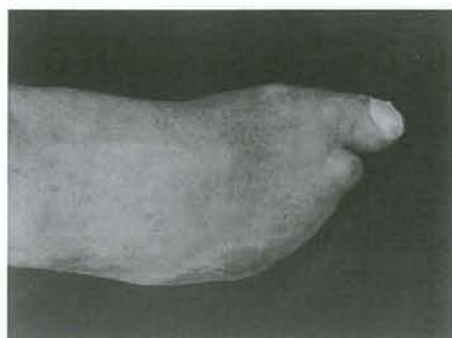
図3 強皮症 左下肢 (症例6)



治療前



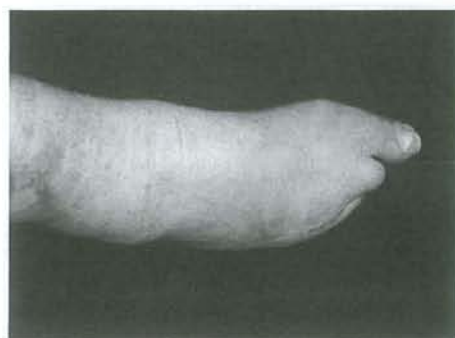
1ヶ月後



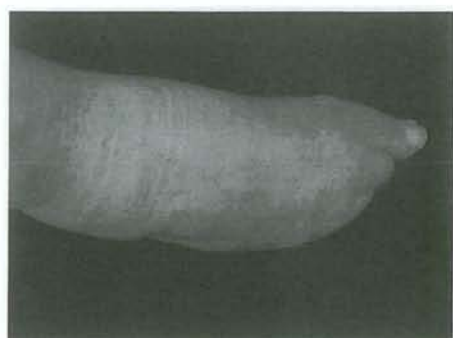
2ヶ月後



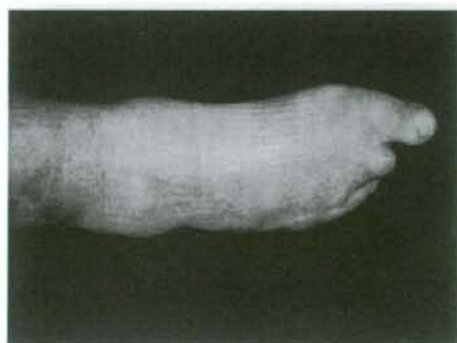
3ヶ月後



6ヶ月後



1年後



2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。その後、再度、血管再生療法を施行し完全に良くなった。今回、その後の治療も継続し維持できている。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2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、3年11ヶ月、2年11ヶ月、1年1カ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。

文 献

- 1) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:964-967, 1997
- 2) Takahashi T, Kalka C, Masuda H et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 5:434-438, 1999

- 3) Murohara T, Ikeda H, Duan J et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 105:1527-1536, 2000
- 4) Shintani S, Murohara T, Ikeda H et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 103:897-903, 2001
- 5) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomized controlled trial. *Lancet* 360:427-435, 2002
- 6) 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Burger病の1症例。 *Angiology Frontier* 7: 63-67, 2008