

- 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* 275: 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

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
信州大学医学部心臓血管外科¹、循環器内科²、輸血部³

研究要旨

信州大学では、従来の内科的・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22年1月現在までに自己骨髄細胞移植による血管再生療法を26例に対し施行してきている。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～21年度の本学会において報告してきた。現在までに、当院にて自己骨髄細胞移植を施行した症例数は26例で全体の奏効率は73%（有効19例、無効7例）であった。全症例の62%（26例中16例）がBuerger病症例で、Buerger病に限ると、奏効率86%（有効13例、無効2例）であった。また、閉塞性動脈硬化症、Buerger病以外の膠原病を中心とした虚血肢に移植を施行した症例は11例で、その奏効率は55%（有効6例、無効5例）であった。移植が無効であった7例の内訳はCREST症候群1例、Behcet病1例、Buerger病にて移植後一時症状改善後に再増悪を認めた再移植例2例、および抗リン脂質抗体症候群3例であった。自己骨髄細胞移植においてはその効果判定に有効とされる客観的評価が定まっていないのが問題点であるが、当院で行っている各種検査での奏効率をみると、臨床症状での奏効率が19例（73%）であったのに対し、サーモグラフィーで改善が認められた症例は15例（68%）、DPIでは10例（45%）、DSAでは5例（41%）と順に減少し、これと臨床症状との相関をみた場合、それぞれの検査のsensitivityはサーモグラフィー83%、DPI 56%、DSA 41%とサーモグラフィーが最も臨床症状と相関していることが示された。無効症例7例の検討の結果、7例のうち6例が急性増悪症例であり、6例は全例ともに急性増悪期に自己骨髄細胞移植を施行している。また再移植例2例はともに初回施行時有効であったにも関わらず再施行時は無効であった。局所に感染を伴っていた3例はどれも無効であった。以上の臨床結果から非Buerger病症例および再施行症例、急性増悪期にあるもの、感染合併が骨髄細胞移植の効果発現を妨げる因子であると考えられた。明らかな効果を持つ本治療法は、単独では困難な症例に対しても、適切な治療方針で応用することにより将来的にも有効な選択肢となるものと考えられる。

緒言

従来、成人における血管新生（angiogenesis）は既存の内皮細胞（Endothelial cells: ECs）の増殖によると考えられていた。Isnerら¹はその概念に基づき1994年に、ウサギ下肢虚血モデルに対する組み換え血管内皮細胞増殖因子（vascular endothelial growth factor: 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。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。この報告は重症虚血肢に対する血管新生療法の先駆けとなり、その後様々な研究がされてきた。これまで

にVEGF以外にも塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor) による遺伝子治療の臨床試験が行われ、初期の検討では有効性と安全性が報告されたが³、その後の無作為割付による臨床試験においては一貫した治療効果を認めなかったと報告されている^{4,5}。また、1997年にAsaharaら⁶は骨髓に由来する内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cells: EPCs) 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 (vasculogenesis) に関与することを報告した^{7,8} (CD34、CD133、VEGFR2^{9,10})。このことは遺伝子治療と異なり、自己細胞を用いた細胞治療という新しい治療法を導くきっかけとなった。2000年にKalkraら¹³はマウス下肢虚血モデルに対するヒトEPCsを虚血肢に筋肉注射し、EPCs移植治療の有効性を報告した。同年、Muroharaら¹⁴はラット下肢虚血モデルに対して臍帯血より採取したEPCsを虚血肢に筋肉注射し、その有効性を報告した。しかし、現状では自己臍帯血を使用することは不可能であったため、彼らは2001年にウサギ下肢虚血モデルに対し、ウサギ骨髓単核球細胞 (bone marrow mononuclear cells: BM-MNCs) を虚血肢に筋肉注射し、その有効性を報告した¹⁵。その後、日本においては2002年にTateishiら¹⁶により重症虚血患者に対する自己骨髓細胞移植の有効性と安全性が報告された。

信州大学附属病院先端心臓血管病センターにおいても、2003年より2010年1月までに26例に対し自己骨髓細胞移植による血管新生療法を行っており、平成20年度までに報告した通り臨床的に比較的良好な臨床成績を収めている。本報告では、平成21年度までの信州大学附属病院における自己骨髓細胞移植の臨床成績と展望について改めて検討する。

方法

自己骨髓細胞移植療法を行った患者は日常生活が著しく障害されている重症末梢動脈疾患で、外科的治療困難と考えられる、原則として20歳以上75歳未満の患者で、妊娠中および妊娠の可能性のある女性、なんらかの原因により余

命1年未満と考えられる患者、3ヶ月以内にアルコール・薬物依存症が見られた患者、悪性腫瘍、重症の糖尿病性網膜症、重症の虚血性心疾患、脳卒中の既往、インフォームドコンセントが得られない患者については適応外とした。信州大学における適応基準は以下の通りである。

信州大学における四肢虚血性疾患に対する自己骨髓細胞移植の適応

- ・日常生活が著しく障害されている重症末梢動脈疾患
- ・原則として20歳以上75歳未満

除外項目

1. 妊娠中および妊娠の可能性のある女性
2. なんらかの原因により余命1年未満と考えられる
3. 3ヶ月以内にアルコール・薬物依存症
4. 悪性腫瘍 (有する・5年以内の既往・疑い全て)
5. 重症の糖尿病性網膜症
6. 重症の虚血性心疾患
7. 脳卒中の既往
8. インフォームドコンセントが得られない
9. その他 (主治医の判断)

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22年1月現在までに自己骨髓細胞移植による血管再生療法を26例に対し施行し、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った。

全身麻酔下、両側の腸骨より骨髓液を約600ml採取した。この時、細胞分析用に骨髓液3mlをベノジェクト[®]DK[Terumo, Japan]真空採血管を用い保存した。採取した骨髓液をAS204[Fresenius HemoCare, Germany]を用いて単純遠心法にてBM-MNCsを分離し、50mlに濃縮した。濃縮したBM-MNCsを虚血部の下肢または上肢30~40ヶ所 (10⁸細胞/0.5ml/1ヶ所) に26G針を用いて筋肉内投与した。

結果

2003年11月から2010年1月現在までに信州大学医学部附属病院先端心臓血管病センターにおいて自己骨髄細胞移植を施行した症例数はのべ26例で、男性16例、女性10例、平均年齢は49.8±13.5 (29~71)、平均観察期間は40ヶ月 (2~47ヶ月) であった (図1)。26例のうち2例は再施行例でいずれも Buerger病であった。26例のうち16例 (62%) は Buerger 病で、38% が非 Buerger 病であった。非 Buerger 病10例の内訳は閉塞性動脈硬化症2例、PSS1例、Behcet 病1例、CREST 症候群2例、抗リン脂質抗体症候群3例、弾性線維性仮性黄色腫 1 例であった (図2)。Fontaine分類上、Ⅱ° の症例を2例認めた他は、Ⅲ° 6例、Ⅳ° 18例と重症虚血肢がほとんどで、移植対象肢は1肢14例の他は、2肢10例、3肢2例と多肢にわたる移植例も46%を占めた (図3)。

図4に Buerger 病16症例、図5に non-Buerger 病10例の症例一覧を示し、さらに臨床成績に影響を及ぼす要因について検討した (図6)。全体の奏効率は73% (有効19例、無効7例) であった。Buerger 病に限ると、奏効率86% (有効14例、無効2例) であった。また、閉塞性動脈硬化症、Buerger 病以外の膠原病を中心とした虚血肢に移植を施行した症例は10例で、その奏効率は60%であったが、ASOを除外したAPSを含む膠原病症例のみで検討すると、奏効率は50% (有効4例、無効4例) にとどまった。また、病態別に検討すると、潰瘍・壊疽の急性増悪症例の奏効率は14% (有効1例、無効7例) で、再移植症例での奏効率は28% (有効2例、無効7例) で、感染合併症例での奏効率は42% (有効3例、無効7例) であった。

移植が無効であった7例の内訳はCREST症候群

図1 信州大学における自己骨髄細胞移植症例

2003.11 ~ 2009.11	26 移植 (23 症例)
男性 : 女性	15 : 9
年齢	49.8 ± 13.5 歳 (29-71歳)
追跡期間	40ヶ月 (3-72ヶ月)

図2 対象疾患

疾患	症例
Buerger disease	16 (62%)
Atherosclerosis obliteran (ASO)	2 (8%)
Progressive systemic sclerosis (PSS)	1
CREST syndrome	2
Antiphospholipid antigen syndrome (APS)	3
Pseudoxanthoma elasticum (PXE)	1
Behcet Disease	1
Total	26

図3 重症度、対象肢、結果

Fontaine	Ⅱ	2 症例	(92%)
	Ⅲ	6 症例	
	Ⅳ	18 症例	
移植対象肢	1肢	14 症例	(46%)
	2肢	10 症例	
	3肢	2 症例	
効果	有効	19 症例	(73%)
	不変・無効	7 症例	
	(移植肢再発)	4 症例	

1例、Behcet 病 1例、Buerger 病にて移植後一時症状改善後に再増悪を認めた再移植例 2例、および抗リン脂質抗体症候群 3例であった (図7)。無効症例 7例のうち、急性増悪期に移植を行った症例が 6例含まれており、また再移植例 2例

図4 Buerger 病

case	age	sex	pre Fontaine	post Fontaine	clinical results	
1	62	M	IV	断端形成→II	effective	recurrence
2	30	M	IV	I	effective	recurrence
5	46	M	II	I	effective	
6	44	M	II	I	effective	
8	31	M	IV	断端形成→I	effective	recurrence
10	38	M	IV	I	effective	
11	55	M	IV	II	effective	
12	56	F	IV	断端形成→II	effective	recurrence
13	49	M	IV	II	effective	
14	30	M	III	I	effective	
16	45	M	IV	II	effective	rapid progression
17	64	M	III	切断	not effective	re-do (case 1), smoking rapid progression
18	49	M	III	II	effective	
20	57	F	IV	切断	not effective	re-do(case12), infection, rapid progression,
23	68	M	IV	I	effective	
26	50	M	IV	植皮→治癒傾向	effective	

図5 non-Buerger 病

case	age	sex	disease	pre Fontaine	post Fontaine	clinical results	
3	71	M	ASO	III	II	effective	
4	41	F	PXE	III	II	effective	recurrence
7	60	F	ASO	IV	I	effective	
9	36	F	PSS	III	I	effective	
15	62	F	CREST	IV	切断	not effective	rapid progression, infection
19	29	F	APS	IV	I	effective	Lt lower/upper, stable
				IV	IV	not effective	Rt lower, rapid progression
21	58	F	APS	IV	切断	not effective	
22	58	F	CREST	IV	II	effective	
24	63	M	APS	IV	切断	not effective	rapid progression, infection
25	47	F	Behcet	IV	切断	not effective	rapid progression

はともに初回施行時有効であったにも関わらず急性増悪期に行った再移植時は無効であった。各種検査毎の奏効率をみると、臨床症状での奏効率が73%であったのに対し、サーモグラフィで改善が認められた症例は68%、DPIでは45%、DSAでは41%と順に減少し、これと臨床症状との相関をみた場合、それぞれの検査のsensitivityはサーモグラフィ83%、DPI 56%、DSA 41%とサーモグラフィが最も臨床症状と相関していることが示された(図8)。

また、再発(増悪)例は非移植を含め5例に認め、移植肢再発は4例であった(図9)。4例は全てBuerger病症例であり、うち2例は前述の再移植を行った2例であり、1例はバイパス手術を行い、1例は経過観察中である。今回の当院での骨髄細胞移植症例全体の再発率は26%であ

り、Buerger病症例の再発率は29%、非Buerger病症例の再発率は17%であった(図10)。ただし、Buerger病再発症例4例中、禁煙を維持できなかった症例を2例に認めた。

考 察

当院ではBuerger病以外の重症虚血肢のうち、閉塞性動脈硬化症については初期のBelow the knee lesionへのdistal bypass閉塞の2症例を除き全例にカテーテルインターベンションおよび外科的血行再建を第一選択としており、また糖尿病透析合併例においては心疾患などの重症全身疾患合併のため、当院の自己骨髄細胞移植の適応基準により適応外とされることが多く、疾患内訳はBuerger病を中心に難治性血管炎がそのほとんどを占める結果となっている。Buerger

図6 奏効率におよぼす要因

	奏効率	19/26 (73%)
Burger 病	14/16 (86%)	
非Burger 病	6/10 (55%)	
Rapid progression	1/7 (14%)	
Re-do cases	2/7 (28%)	
Infection	3/7 (42%)	

図7 無効例 7 例の検討

Case No.	Age	Sex	Disease	Fontaine	Target	
15	62	F	CREST	IV	lower	rapid progression infection
17	64	M	Buerger	III	upper	rapid progression re-do, smoking
19	29	F	APS	IV	lower	rapid progression
20	57	F	Buerger	IV	lower	rapid progression infection, re-do,
21	48	F	APS	IV	lower	
24	63	M	APS	IV	lower	rapid progression infection
25	47	F	Behcet	IV	lower	rapid progression

図8 再発例の検討 (非移植肢再発 2 肢を含む)

Case No.	Age	Sex	Disease	Freedom from recurrence	Clinical cause	smoking	
1	62	M	Buerger	22M	IV→断端形成→断端潰瘍	+	Re-BMI→amputation
2	30	M	Buerger	72M	IV→I→II		Bypass graft stenosis →PTA
4	41	F	PXE	60M	非移植肢 IV		PTA→II
8	31	M	Buerger	60M	IV→I→IV	+	infection
12	56	F	Buerger	18M	非移植肢 IV		Re-BMI→amputation
				54M	IV→断端形成→III		経過観察中

病や膠原病であっても、動脈造影でカテーテルインターベンションおよび外科的血行再建によるrecanalizationが可能な血管が認められない症例またはそれに準ずる症例が移植適応となっているため、結果として自己骨髄細胞移植症例は四肢の指先血管から閉塞を認めるものに限られている。このため結果として閉塞性動脈硬化症が骨髄細胞移植の適応となることはほとんどない。

図9 再発例 6 肢の検討 (非移植肢増悪 2 肢を含む)

	再発率	5/19 (26%)
Burger 病	4/13 (29%)	
(smoking 2, bypass graft stenosis 1)		
非Burger 病	1/6 (17%)	
移植肢再発	4/19 (21%)	52±21.4 M
非移植肢増悪	2/19 (11%)	39±29.7 M

はほとんどない。施設による治療適応の違いが治療成績に影響することも考えられるが、当院における上述の適応基準から移植適応となったBuerger病症例における奏効率86%は良好であった。一方で、APSを含む膠原病症例のみで検討すると、奏効率は50% (有効4例、無効4例)にとどまった。Buerger病以外の症例数が少なく、各疾患の症例数は3人以下であり、さらに各疾患における血管病変の状態も違うため一概には評価できないものと考えられるが、Buerger病に比べて治療成績が劣っていた。APSを含む膠原病症例の無効症例4例はAPS2例およびCREST症候群1例、Behcet症候群1例で4例中3例は壊疽および潰瘍の急性増悪症例であり、このうち2例は感染を合併していた。病態別に検討すると、潰瘍・壊疽の急性増悪症例の奏効率は14%で、再移植症例での奏効率は28%で、感染合併症例での奏効率は42%であり、これらの

図10 各種検査と臨床症状の相関

	奏効率	Sensitivity
Clinical results	18/25 (72%)	
Thermography	15/22 (68%)	15/18 (83%)
DPI	10/22 (45%)	10/18 (56%)
DSA	5/12 (41%)	5/12 (41%)

病態は治療成績の増悪因子であることが示唆された。特に、症例15（62歳・女性 CREST症候群）は、虚血により足底部を中心に広範囲の壊疽および潰瘍形成を認め色調不良な足底筋が露出した状態であった。短期間に潰瘍の増悪を認めており、術前より救肢困難と判断されたが、本人の治療希望強く、状態の改善が得られれば皮膚移植の可能性も考えられた。移植後、露出した足底筋組織の経時的変化の観察が可能であったが、自己骨髄細胞移植により、CREST症候群の血管病変による潰瘍の増悪傾向を止めることはできなかった。症例17（65歳・男性 Buerger病）は、症状の増悪のため2回目の自己骨髄細胞移植を施行した。初回の移植により安静時痛は明らかに改善したが、消失は得られず、さらに移植後1年後頃より徐々に安静時痛の再増悪を認めていたため本人が再移植を強く希望した。骨髄細胞数が少ないため、2回目の移植では術前にGCSFを併用した。2回目の移植による安静時痛の改善は、ほとんど得られなかった。後日、禁煙が継続できていなかったことが確認されたが、改めてBuerger病症例においては長期成績の向上のため禁煙維持が重要であるものと考えられる。

症例19（29歳・女性 APS）は両下肢に移植を行っているが、比較的症状の安定していた左下肢は改善が見られたが、急性増悪期にあった右下肢については移植後も増悪が続き、ついには切断となった。同じ個人において有効肢と無効肢が同時に存在することは、本治療法の効果発現の予測困難性を示しているが、今後、疾患別の成績とともに閉塞病変の詳細な部位や範囲の評価による細胞移植治療の適応検討も重要になってくるものと考えられる。2006年度に移植を行った症例20（57歳・女性）はBuerger病症例の再施行例であり、初回施行時には自己骨髄細胞移植が著効した症例であるが、再施行時には感染を伴った急性増悪期にあり、二度目の移植は無効で切断に至った。2007年度に移植を行った症例23（63歳・男性 APS）もまた感染を伴った急性増悪期にあり、移植後の治療効果は無効であった。以上より、急性増悪期に移植を

行った6例のうち5例が無効症例であり、また再移植例2例はともに初回施行時有効であったにも関わらず再施行時は無効であった。局所に感染を伴っていた3例はいずれも無効であった。以上から非Buerger病症例および再施行症例、急性増悪期にあるもの、感染合併が骨髄細胞移植の効果発現を妨げる因子であると考えられた。

また、自己骨髄細胞移植はその効果発現を客観的に評価しうる検査法が未だ確定しておらず、その有効性の評価は主に潰瘍径や自覚症状の改善などに拠っているのが現状である。このことが本治療法の有効性におけるプラセボ効果の疑念を払拭できない大きな理由であるともいえる。本治療法の確立のためにも臨床症状と相関する客観的評価方法の確立が急務であるといえるだろう。当院における術後評価は、前述のように自覚症状の変化（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・DSAによって行っている。各種検査毎の自己骨髄細胞移植の奏効率をみると、臨床症状での奏効率が18例（78%）であったのに対し、サーモグラフィーで改善が認められた症例は15例（68%）、DPIでは10例（45%）、DSAでは5例（41%）と順に減少し、これと臨床症状との相関をみた場合、それぞれの検査のsensitivityはサーモグラフィー83%、DPI 56%、DSA 41%とサーモグラフィーが最も臨床症状と相関していることが示された。サーモグラフィーは外来で行うことのできる非侵襲的検査であるが、外気温や体温の影響を受けやすく、客観性にやや乏しいことが欠点である。一方で本治療法が血管新生を目的とするものでありながら血管造影検査において新生血管が描出できる症例が少ないことは、現在考えられている本治療法のメカニズムに検討の余地があることを示し、評価方法の確立は治療メカニズムの解明と並行して進められるべきものであると考えられる。

当初、自己骨髄細胞移植療法は血管新生療法として開発されたが、その後移植されたBM-MNCsが移植の7日後までに虚血筋肉から消え

ることや²⁵、移植したBM-MNCsのアポトーシスが自己骨髄細胞移植後に虚血筋肉で起こることが報告された²⁶。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はなく、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²⁷⁻²⁹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すらあり¹⁷、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ピ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、移植細胞はレシピ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えるだろう。

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問題と考えられる。このこともまた、虚血局所における宿主側の微小循環の違いとも考えられる。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。これまでに骨髄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。これまでに骨髄細胞移植併用療法として、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と骨髄細胞移植との併用が効果的であったと報告している¹⁸⁻²⁰。臨床症例の中で骨髄細胞移植の効

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とされる報告があるが、これらもまた、骨髄細胞移植の効果が炎症性サイトカインを通じて発揮されているという仮説を裏付けるものである。

本治療法のような血管新生療法の進歩と同時に、カテーテルインターベンション、外科的血管再建の技術も年々進歩を遂げており適応疾患も拡大傾向にある昨今、血管新生療法の適応となる症例はますます重症化する傾向にある。当院においても2003年の開始当時に比し、症例の多肢化、重症化、ハイリスク化が進んでおり、特に広範囲潰瘍を伴った非 Buerger 病症例が増えつつある。これに伴い、治療法の適応に苦慮する症例が増えつつあることと相俟って、奏効率は年々低下傾向（平成16年の当院の本報告では奏効率100%）にある。疾患別、症例別の有効性の予測のためにも、本治療法のメカニズムのより詳細な解明が急務であるとともに、重症例における効果増強を目指して、他の治療法との併用療法を探求していく必要があると思われる。実際大量の骨髄細胞（一般に $3\sim 5\times 10^9$ 個、うちCD34陽性細胞 $2\sim 7\times 10^7$ 個）を移植しているにも関わらず、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関わらず、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はなく、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すらあり¹⁷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ピエント

血液中を循環する血管内皮前駆細胞であると思われる、移植細胞はレシピ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えるだろう。

これらの理論的背景と当院の骨髄細胞移植症例の治療成績を検討すると、現段階では骨髄細胞移植がもたらす臨床的な微小循環の改善効果が示されているものの、その効果は直接本来のinflowを改善するインターベンション治療や外科的血行再建術と同格の効果を発揮するには至っていない。特に、急性増悪や感染などの悪化因子を伴っている場合、移植により十分な効果を得ることは難しいものと考えられる。当院では、インターベンション治療や外科的血行再建がそれらの専門医の判断で適応とならない、Buerger病を含む難治性血管炎による安静時痛症例や軽度潰瘍症例が現時点での自己骨髄細胞移植の良い適応であるものと考えているが、今後、壊疽を来たした症例であっても、切断にあたり切断端の治癒を目指すための骨髄細胞移植も検討しうると考えられ、また、インターベンション治療や外科的血行再建によりrecanalization可能であっても、さらに末梢のrun-offが不良な症例に対し、これらの治療とハイブリッド治療を行う選択肢も考えられ、これらの可能性についても今後さらに症例を重ね検討していく必要があると考えられる。

結 語

当科におけるBMIの中期の奏効率は78%であったが、非Buerger病症例およびre-do症例のBMI成績はBuerger病の初回施行例に比し不良であり、また急性増悪経過中にBMIを施行した6例の奏効率は17%、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。

当科で行っている各種検査のうち、症状と最も相関していた検査はサーモグラフィーであった。従来の治療法が適応とならない症例に対し、明らかな治療効果を認めており、今後、血行再建術とのHybrid治療や切断端治癒を目指した切断との併用など治療選択肢の増加に寄与する治療であると考えられる。本治療法は、単独では困難な症例に対しても、適切な治療方針で応用

することにより将来的により有効な治療選択肢となるものと考えられる。

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* 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 ischaemic limb. *Lancet* 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* 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* 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. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34 (+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95: 952-8, 2000
 10. Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, et al. In vivo differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 95: 3106-12, 2000
 11. 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
 12. 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
 13. 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
 14. 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
 15. Tateno K, Minamino T, Miyauchi H, et al. Application of hematopoietic cells to therapeutic angiogenesis. *Curr Pharm Des* 12: 557-63, 2006
 17. 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
 19. 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
 20. 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
 21. 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
 22. Ingber DE. Fibronectin controls capillary endothelial cell growth by modulating cell shape. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 3579-83, 1990
 23. 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
 24. 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
 25. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Sasaki K, et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 103: 897-905, 2001
 26. 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: 543-51, 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

重症下肢虚血に対する体外増幅自己赤芽球を用いた血管再生治療

分担研究者 相澤義房
研究協力者 小澤拓也、鳥羽 健
新潟大学医歯学総合研究科器官制御医学

研究要旨

【目的】

重症虚血状態の難治性血管炎に対して骨髄細胞移植（BMI）が行われてきたが、さらなる治療効果の改善が求められる。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報告した。今回、少量の骨髄細胞からこれらの細胞を培養・増幅し血管再生治療に応用（EVEETA）した第I/II相臨床試験の結果につき報告する。

【方法と結果】

対象は標準的治療が無効の難治性血管炎6症例。局所麻酔下に少量の骨髄液（平均68.5ml）を採取し単核細胞成分を分離後、細胞プロセッシング室でFlt-3L・SCF・トロンボポエチンの存在下で7日間培養し未分化前駆細胞を増幅、引き続き7日間エリスロポエチン・SCF・IGF-Iの存在下で培養し前赤芽球とマクロファージを増幅した。得られた細胞を虚血下肢に筋注し5日間エリスロポエチンを局所に筋注した。移植後、下肢痛の速やかな軽減、難治性皮膚潰瘍の治癒、血管造影所見の改善、組織酸素分圧の上昇を得られた。いずれの症例も有害事象は認めなかった。

【展望】

体外増幅赤芽球移植による血流改善効果は従来のBMIより強力であり、患者への侵襲も少なく、重症虚血肢に対する次世代血管新生治療として期待できる。

緒言

重症下肢虚血症例に対する自己骨髄細胞移植（BMI）はこれまで最も広く行われてきた血管新生療法である¹⁾。当施設においても高度先進医療の認可を受け積極的にBMIを行ってきたが、真に血管再生を必要とする重症患者に対しての効果はまだ改善の余地がある^{2,3)}。

我々は骨髄細胞のうちVEGF, PLGF等の血管増殖サイトカインを分泌しているのは主に赤芽球であり、BMIによる血管再生には赤芽球が必須であることを示した³⁾。

またBMIでは全身麻酔下に500～1,000ccの骨髄を採取するため患者への侵襲が大きいこと、さらには実際にBMIを施行したASO等の患者骨髄総細胞数およびCD34陽性細胞数は健康人に比し、1/2ないし1/10程度であり、重症虚血患者ほど著しい低形成を示すことから、これらの問題点を克服するための方策として、少量の自己骨髄から十分量の幼弱赤芽球を体外で増幅する培養技術、すなわち体外増幅自己赤芽球移植による血管新生治療（Ex-Vivo Expanded Erythroblast Transplantation (Autologous)）：

EVEETA療法の開発に着手した。健康ヒト骨髓を用いて培養法の試行錯誤を行った結果、TPO等3種の造血因子の存在下で7日間培養（1次培養）することで赤血球前駆細胞が増幅され、さらにこれをEPO等3種の造血因子の存在下で7日間培養（2次培養）することで、大量の未熟赤芽球が収穫された（平成20年度報告参照）。

マウス下肢虚血モデルを用いてEVEETA治療とBMI治療を比較検討したところ、EVEETA（ 10^6 cells）はBMI（ 10^6 cells）に比し有意に下肢血流を改善させ、その効果は10倍量の細胞数を用いたBMI（ 10^7 cellsを移植）と同等の治療効果を示すほど強力であった。

方法

平成18年秋に当施設に設置の倫理委員会および臨床研究審査委員会（IRB）から当該第I/II相臨床試験の認可を受けた。先述の十分な基礎検討のもと、当施設CPCを利用し、平成19年より体外増幅自己赤芽球移植による血管新生治療（EVEETA study）の第I/II相臨床試験を開始した（ISRCTN-66803682）。

対象は従来のBMIと同様に末梢性血管疾患（慢性閉塞性動脈硬化症・難治性血管炎〔ビュルガー病・膠原病に伴う血管炎など〕）Fontaine分類Ⅱb・Ⅲ度およびⅣ度で、著しくQOLが障害されており血行再建術の適応が無く、将来切断が予想される患者、年齢は20歳以上80歳未満、

患者の人権や安全性に十分配慮し、説明と同意の後に試験への参加を許可した。移植の14日前に患者の両側腸骨より局所麻酔によって約40mlの骨髓を採取し、速やかに細胞数を計測し、不十分な場合には胸骨より局所麻酔によって不足分の骨髓を採取した。

上述のごとくトロンボポエチン、SCF、Flt3L等の存在下で7日間培養（1次培養）することで赤血球前駆細胞を増幅し、さらにこれをEPO、SCF、IGF-1の存在下で7日間培養（2次培養）して大量の未熟赤芽球を収穫した。細胞に用いた試薬の混入を防ぐために培養細胞を十分に洗浄したのち、各施設へ培養後の細胞を出荷し、移植は細胞を患部に筋肉内注射により投与した。移植当日を含む5日間、移植部位局所にEPO 6000国際単位を連日筋肉内投与した。

定法に従い、自覚症状（VAS）・歩行距離・下肢血管造影による血流の評価・皮膚温や組織酸素分圧、皮膚灌流圧、Ankle-Brachial pressure index（ABI）等の測定によって、治療効果を客観的に評価した。

結果

これまですでに7例の末梢血管疾患患者（うち難治性血管炎は6例）に対してEVEETA治療を施行した（表）。平均採取骨髓量は69.4mlであった。採取した骨髓細胞数が少なく十分な培養細胞を得られなかった症例もあったが、十分

治療前とEVEETA施行4週後の結果

	VAS (mm)	TcO2 (mmHg)	skin ulcer	SPP (mmHg)	DSA	Thermography	総合判定
Case 1 TAO	51→2	25→50	治癒	-	改善	不変	著効
Case 2 SSc	2→0	67→50	-	-	不変	不変	不変
Case 3 TAO	7→6	37→44	-	-	わずかに改善	不変	有効
Case 4 TAO	80→24	43→38	完全に上皮化	13→39	不変	改善	有効
Case 5 SLE	62→13	2→3	完全に上皮化	13→42	不変	改善	有効
Case 6 ASO	31→14	20→9	縮小	22→44	改善	改善	著効
Case 7 TAO	20→11	8→4	縮小	22→25	改善	改善	著効

量の細胞数を移植できた症例では、すみやかな下肢痛の軽減及び消失、難治性皮膚潰瘍の治癒、血管造影での側副血行増加といった非常に良好な結果を得られた。なお、これまで明らかな有害事象は認められていない。

考 察

EVEETA症例では十分量の細胞数を移植できた症例では非常に良好な治療効果が得られた。特に疼痛改善効果、潰瘍の治癒、血管造影所見の改善といった点ではBMIよりも優れた治療効果を得られている印象がある。さらに注目すべきは症例7である。症例7は過去に他施設でBMIを2回受けたが無効であり、我々の開発したEVEETA治療には著効した。これはEVEETA治療がBMIに比し非常に強力な治療法であることを示唆するものと考えている。今後は再発例、無効例においても積極的にEVEETA治療を検討すべきと思われた。

結 語

難治性血管炎症例に対する細胞移植治療は有効であった。また、体外増幅赤芽球移植による血流改善効果は従来のBMIよりさらに強力であり、患者への侵襲も少なく、重症虚血肢に対する次世代血管新生治療として期待できる。

文 献

1. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. 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. *Lancet*. 360(9331):427-35, 2002
2. Prognostic factors for critical limb ischemia after autologous bone marrow implantation. Oda M, Kato K, Toba K, Otaki K, Kitajima T, Ikarashi N, Yanagawa T, Higashimura M, Asami F, Isoda M,

Ozawa T, Moriyama M, Hirono S, Okura Y, Hanawa H, Kodama M, Aizawa Y. *J Cardiol*. 50(4):235-42, 2007

3. Clinical application of bone marrow implantation in patients with arteriosclerosis obliterans, and the association between efficacy and the number of implanted bone marrow cells. Saigawa T, Kato K, Ozawa T, Toba K, Makiyama Y, Minagawa S, Hashimoto S, Furukawa T, Nakamura Y, Hanawa H, Kodama M, Yoshimura N, Fujiwara H, Namura O, Sogawa M, Hayashi J, Aizawa Y. *Circ J*. 68(12):1189-93, 2004
4. Erythroid cells play essential roles in angiogenesis by bone marrow cell implantation. Ozawa T, Toba K, Kato K, Minagawa S, Saigawa T, Hanawa H, Makiyama Y, Moriyama M, Honma K, Isoda M, Hasegawa G, Naito M, Takahashi M, Aizawa Y. *J Mol Cell Cardiol*. 40(5):629-38, 2006

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11症例での有効性を報告している。今回更に3症例（症例12～14）に対し施行したため、その臨床経過を報告するとともに移植例14例についての評価をまとめた。また、骨髓血のろ過装置および血球分離装置が変更となったため、変更前後の血球分離について検討した。

方法としては、腸骨より骨髓液を約400～800ml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3症例（症例12～14）に対しより広い範囲で同療法を施行したが、治癒傾向が認められた。

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。今回施行した3症例について以下に病歴を記す。

症例12；60歳、女性。2002年9月 PIP 関節の腫脹・レイノー現象出現。2003年3月当科受診。レイノー現象、抗核抗体160倍（speckled）、強指症、両手背皮膚硬化、組織学的浮腫性硬化を認め、強皮症と診断。以降冬期を中心に手指のしびれが増悪。2005年当科受診時右手指第3指の潰瘍認められ、以後手指潰瘍が繰り返すため2009年3月23日血管新生療法目的に入院。四肢；右2,3,4 左2,3 指尖に潰瘍。

症例13；59歳、女性。2002年レイノー現象が出現。徐々にレイノー現象が悪化。2008年12月左手3指の壊死が出現、ワーファリン5mgとサルボグレラート300mg投与も改善せず。2009年

5月22日指尖潰瘍および壊死が改善しないため、紹介受診。2009年7月13日血管新生療法目的に入院。

胸部：大動脈弁領域より拡張期雑音あり、呼吸音：右側胸部および背部より吸気時に捻髪音聴取。左第3指指先潰瘍（+）（黒色）右第2,3,5指指先潰瘍（+）。

症例14；49歳、女性。2004年3月右下腿に暗赤色の皮疹が出現。2005年2月皮膚型結節性多発動脈炎と診断、PSL 30mgと cyclosporin 開始。2008年2月朝のこわばりを自覚。潰瘍の併発からリウマトイド血管炎と診断。8月31日下腿潰瘍に対する血管新生療法目的に入院。

四肢：両下腿・両前腕に網状皮斑あり。右下腿潰瘍あり。両足背動脈触知せず。

<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性心疾患、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400～500mlの骨髓液を採取。Bone Marrow Collection System（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 血球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、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40～90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class III 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、今年度試行した3例（症例12～14）を含めると全身性強皮症8例（症例1～6、12、13）および全身性エリテマトーデス4例（症例7,8,10,11）、混合性結合組織病（症例9）、関節リウマチ（症例14）の各1例であり、年齢は30～72歳、全て女性であった。罹病期間は5～35年であった。（表1）

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390～900 mlおよび $5.4 \sim 107.8 \times 10^9$ cellsであった。実際に一患肢あたり移植した生細胞数は $0.59 \sim 3.44 \times 10^9$ cellsであり、このうちCD34陽性細胞は、 $0.46 \sim 7.58 \times 10^7$ 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（4ヶ月～5年6ヶ月）、移植前に認めた皮膚潰瘍は症例10、14を除き全例で上皮化した。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、再発症例は13症例中4症例（症例5、7、10、11）であった。再発症例においても改善までの期間は血管新生療法施行前よりも短縮していた。

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
診断名	SSc	SSc	SSc	SSc	SSc	SSc	SLE	SLE
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
自覚症状								
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
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	5mg / day	(-)	15mg / day
prostaglandin	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

表1 各症例の臨床的特徴 (2)

	症例 9	症例 10	症例 11	症例 12	症例 13	症例 14	平均または集計
診断名	MCTD	SLE	SLE	SSc	SSc	RA	
年齢 (yr) / 性別	30 / F	54 / F	61 / F	61 / F	60 / F	49 / F	54.9 ± 3.1
罹病期間 (yr)	14	10	35	7	7	5	15.5 ± 2.7
自覚症状							
Raynaud現象	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	13/14
m-Rodnan TSS (0-51)				30	7		
SHAQ (0-60)	0	6	12	5	1	2	20.4 ± 4.0
臓器合併症							
cardio-pulmonary	(-)	IP	(-)	IP	IP	(-)	IP 4
gastro-intestinal	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	GERD 4 PBC 2
自己抗体							
ANA	1280 sp	640 sp	1280 sp	1280 sp	160 sp	640 sp	
anti-centromere	< 7.0	< 7.0	< 7.0	< 7.0		< 7.0	5/14
anti-Scl 70	< 7.0	< 7.0	< 7.0	< 7.0	< 7.0	< 7.0	2/14
anti-RNP	6320	151	2680				5/14
血管新生までの治療法							
PSL	7mg/day	18mg/day	(-)	(-)	(-)	20mg/day	7/14
prostaglandin	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	12/14

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 (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2 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	症例 12	症例 13	症例 14	平均
採取骨髓液量 (ml)	535	510	770	900	600	830	545±45.9
骨髓単核球細胞数 ($10^4/\mu\text{L}$)	3.96	9.81	3.06	1.6	13.6	1.22	5.4±1.5
CD34 ⁺ 細胞 / μL (%)	765 (2.61)	405 (0.47)	575 (2.16)	801 (1.92)	1613 (3.66)	1075 (2.64)	1575.3±253.2 (2.28±0.27)
移植された単核球 生細胞数(10^9 cells)	0.59	2.40	1.18	1.89	1.99	1.85	1.64±0.21
移植されたCD34 ⁺ 生細胞数(10^7 cells)	1.53	1.12	2.59	3.60	7.26	4.84	3.59±0.58

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。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。sHAQ、VASには反映されていないが全症例で指先の痺れ感が改善していた。以上からはsHAQ、VASだけでは十分な評価法になっていない可能性が示唆された。

<有害事象について>

表3に示すとおり、手術直後に悪心、眩暈、

咽頭痛がそれぞれ1症例ずつ、軽度の発熱が5症例に認められたが、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8症例および全身性エリテマトーデス4症例、混合性結合組織病、関節リウマチ各1症例に対し自己骨髓幹細胞移植による血管新生療法を施行した。その結果、症例10、14を除く全ての症例で速やかな疼痛の軽減および潰瘍の治癒が認められた。

表3 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)	65	55	18	53	40	36	21	34
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
皮膚潰瘍の再発	なし	なし	なし	なし	あり	なし	あり	なし

表3 治療経過のまとめ (2)

	症例 9	症例 10	症例 11	症例 12	症例 13	症例 14	平均または集計
フォローアップ期間(月)	20	17	14	8	4	3	27.9±5.3
皮膚潰瘍の転帰	上皮化	表皮欠損	上皮化	上皮化	上皮化	表皮欠損	
有害事象	発熱	なし	発熱	発熱	なし	発熱	
レイノー現象の出現	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	あり	あり	11/14
皮膚潰瘍の再発	なし	あり	あり	なし	なし		4/13

表4 自家骨髄採取におけるまとめ

	8症例のまとめ	症例 9-14
麻酔時間(分)	316±10.0	309±26.0
手術時間(分)	264±8.0	242±23.0
採取時間(分)	40±0	73±9
採取骨髄液量 (ml)	436±21.4	690±67.0
骨髄単核球細胞数 (10 ⁴ /μL)	5.27±2.2	5.54±2.05
.....		
分離時間(分)	201±9.0	134±9.0
分離に使用した自己血(ml)	400	200
.....		
移植時間(分)	23.0±5.0	35±5.0

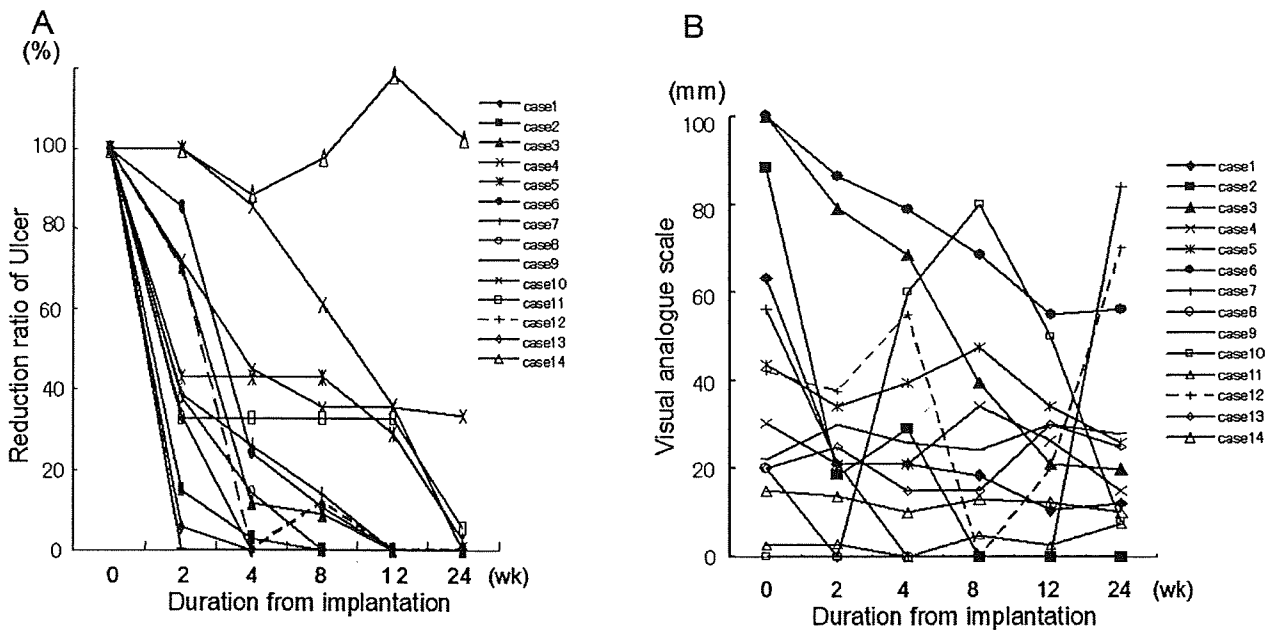


図1 A ; 移植後24週の潰瘍の縮小率、B ; VASの変化

表5 強皮症と他の疾患の比較

	強皮症(8)	その他(6)
年齢	60.5±2.2	47.5±5.5
疾患	Limited 4 Diffuse 4	SLE 4 (APS 3), MCTD 1, RA 1
潰瘍の部位	指7 足1	指2 趾2 下肢2
潰瘍の大きさ (mm ²)	81.2±19.5	754.0±497.3
IP	3例	1例
SHAQ	12.1±5.3	6.5±2.7
生細胞数(10 ⁹)	1.69±0.29	1.57±0.33
CD34 ⁺ 細胞数(10 ⁷)	4.10±0.84	2.59±4.84
再発例	1例	3例

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、骨髓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。

我々の施設では症例8まで使用していた血球分離装置をFresenius COM TECに、骨髓採取システムをBone Marrow Collection System (Baxter)に変更した。表4にまとめた様に分離時間は明

らかに短縮された。同時期より移植肢を単肢から複数肢へ変更したため、採取骨髓液量・採取時間・移植時間の延長を生じたが、結果としての麻酔時間・手術時間はほぼ以前と変わらない状態となり症例への侵襲の増加は避けられた。

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、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可能性がある。表5にまとめた様に強皮症とその他の疾患で比較を行ったところ潰瘍自体の大きさはその他の疾患群の方が大きいにも関わらず症例自体のQoLを示す術前のsHAQでは強皮症群の方が高く、より生活上の不自由を感じて

いるという結果であった。再発例においては強皮症においてやや少ない結果となった。

膠原病・リウマチ性疾患における臓器病変および重症度は多様であり、血管新生療法の安全性に関する評価は今後も注意深く観察する必要があるが、他に有効な治療法がなく難治性潰瘍に苦慮する場合、患者の疼痛による苦痛およびQOLを考慮すると選択されるべき治療法の一つと考えられる。

E. 結論

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、長期経過観察においても安全性、認容性に優れ、新たな治療手段と成り得ることが示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishigatsubo Y, Ihata A et.al. Therapeutic angiogenesis in patients with systemic sclerosis by autologous transplantation of bone-marrow derived cells. *Mod Rheum* (in press)
- 2) Takase K, Ohno S, Ideguchi H, Uchio E, Takeno M, Ishigatsubo Y. Successful switching to adalimumab in an infliximab-allergic patient with severe Behcet disease-related uveitis. *Rheumatol Int* 2009 Oct 9.
- 3) Yamamoto M, Ueda A, Kudo M, Matsuo Y, Fukushima J, Nakae T, Kaneko T, Ishigatsubo Y. Role of MexZ and PA5471 in transcriptional regulation of mexXY in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 155: 3312-21, 2009
- 4) Kanamori H, Enaka M, Ito S, Motohashi K, Hagihara M, Oshima R, Sakai R, Fujisawa S, Tanaka M, Fujimaki K, Fujita H, Ishigatsubo Y, Maruta A. Myeloablative hematopoietic stem cell transplantation for myelodysplastic syndrome in patients younger than 55 years: impact of comorbidity and disease burden on the long-term outcome. *Int J Lab Hematol* (in press)
- 5) Tomita N, Tokunaka M, Nakamura N, Takeuchi K, Koike J, Motomura S, Miyamoto K, Kikuchi A, Hyo R, Yakushijin Y, Masaki Y, Fujii S, Hayashi T, Ishigatsubo Y, Miura I. Clinicopathological features of lymphoma / leukemia patients carrying both BCL2 and MYC translocations. *Haematologica* 94:935-43, 2009
- 6) Kirino Y, Ihata A, Shizukuishi K, Hama M, Takase K, Suda A, Ueda A, Ohno S, Takeno M, Ishigatsubo Y. Multiple extra-articular synovial cysts complicated with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 19:563-6, 2009
- 7) Tomita N, Takeuchi K, Hyo R, Hashimoto C, Takemura S, Taguchi J, Fujita H, Fujisawa S, Ogawa K, Motomura S, Ishigatsubo Y. Diffuse large B cell lymphoma without immunoglobulin light chain restriction by flow cytometry. *Acta Haematol* 121: 196-201, 2009
- 8) Oka H, Ueda A, Watanuki Y, Tsukiji J, Kuroda H, Akashi S, Hirai Y, Fuyuki T, Kaneko T, Ishigatsubo Y. The efficacy of high-dose penicillin for community-acquired pneumonia diagnosed by pneumococcal urine antigen test. *J Infect Chemother* 15: 108-12, 2009
- 9) Hyo R, Tomita N, Takeuchi K, Aoshima T, Fujita A, Kuwabara H, Hashimoto C, Takemura S, Taguchi J, Sakai R, Fujita H, Fujisawa S, Ogawa K, Motomura S, Suzuki R, Ishigatsubo Y. The therapeutic effect of rituximab on CD5-positive and CD5-negative diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol* (in press)
- 10) Kudo M, Matsuo Y, Nakasendo A, Inoue S, Goto H, Tsukiji J, Watanuki Y, Ueda A, Kaneko T, Ishigatsubo Y. Potential clinical benefit of the in situ hybridization method for the diagnosis of sepsis. *J Infect Chemother* 15: 23-6, 2009
- 11) Murakami S, Takeno M, Kirino Y, Kobayashi M, Watanabe R, Kudo M, Ihata A, Ueda A,