

緒言

膠原病では指趾の冷感やレイノー現象がみられることが多い。レイノー現象を認める指趾においては、光学顕微鏡では、毛細血管の内皮細胞腫大に伴う血管内腔の狭小化が観察される。この腫大した内皮細胞は、電子顕微鏡では細胞質内にフィラメントやWeibel-Palade bodyの増生と様々な基底膜の変化が観察される(1)。このような血管の器質的变化により血流障害が生じている指趾に、寒冷刺激が加わると血管が攣縮し阻血の悪循環が惹起される。また、血管障害を有する指趾では血流障害に伴う潰瘍を生じやすく、激しい疼痛を生じる。さらに、膠原病では四肢の皮膚や脂肪織の血管炎により、血流障害を生じ難治性の潰瘍を形成することがある。このような症例では免疫抑制療法だけでは軽快し難く、難治性である。これら血流障害に伴う潰瘍が進行すると、病変が骨まで達して骨髓炎を併発したり、壊死に至って切断を余儀なくされることがあり activity of daily life の著しい低下を招いている。

膠原病に伴う血流障害の治療法としては、Ca拮抗薬(2)、prostaglandin E1(3)、prostaglandin I2(4)などの血管拡張薬が用いられているが、これらの治療法では、奏効することは少なく新たな治療方法の開発が切望されていた。

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

このような背景の下、膠原病に伴う血流障害を有する6症例に対し、自己骨髓単核細胞分画および自己末梢単核細胞分画を別々の肢に単回移植し、自覚症状、手足末梢の血流、手足末梢の皮膚表面温度、新生血管の形成について

1年間評価を行い、その有効性について検討した。その結果、移植する細胞として骨髓単核細胞と末梢単核細胞との間で効果に差が無いこと、またその効果に長期間の持続性が無いことを見出した(9)。

そこで、より患者への負担を軽減させるべく、自己末梢血から単核細胞分画を採取し移植することとした。なお、G-CSF製剤の投与により多発性硬化症や関節リウマチなどの自己免疫性疾患が増悪したという報告があることから(10)、G-CSF製剤を投与せずに末梢血から単核細胞を採取した。移植は難治性や再発性の病変にも対応できるように、また効果を持続させる目的で繰り返し移植を行い、その効果と安全性について研究した。

方法

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

部は、免疫抑制薬に抵抗性であり、範囲が急速に拡大しつつあった。症例6は58歳男性。基礎疾患は罹病歴4年の顕微鏡的多発血管炎。レイノー現象は4年前から出現していた。治療前、右下腿外側に6×3.5cmの急速に拡大しつつある深掘れ潰瘍がみられていた。なお、症例1～3は先に行った研究(9)と同一の症例であり、症例1は自己骨髄血単核細胞の単回移植から1年後、症例3は1年半後に手指尖潰瘍が再発し、症例2は1年3ヶ月後に強い冷感が再発したため、本研究に参加した。

プレドニゾロンは、治療開始時、症例2で5mg/day、症例3と5で10mg/day、症例6で17.5mg/day投与中であった。

移植に用いる単核細胞は、以下の手順で採取した。移植の前々日の午前中に前腕から400mlの全血を採取し、比重遠心分離法により単核細胞分画を分離した。単核細胞分画分離後の血液は速やかに患者に返血した。同日の午後にも同様にして400mlの全血から単核細胞分画を採取した。これら一連の操作を移植前日にも行い、計1600mlの全血から単核細胞分画を採取した。翌日(移植当日)に分離した単核細胞分画をRPMI培地に懸濁して最終量8～16mlに調整したものを、0.2～0.4mlずつ20～80ヵ所手掌および/または足底の骨格筋ないし骨膜下へ注入した。なお、症例1-3は、移植前日の1日だけで全血400～800mlから単核細胞分画を採取した(症例

3の第4回目の単核細胞採取は、2日間にわたり1600mlの全血から単核細胞分画を採取した)。

上記の移植術を、3ヶ月ごとに1年間で計4回繰り返して行い、自覚的および他覚的評価を行った。なお、症例6は2回移植を行い6ヶ月後の評価の時点で潰瘍が完治していたため、6ヶ月で終了とした。評価は、冷感、疼痛および満足度のvisual analog scale (VAS)を用いたアンケート調査、サーモグラフィーによる手指または足趾尖部皮膚表面温度の測定、ankle brachial pressure index (ABI)の測定、皮膚組織灌流圧 (skin perfusion pressure (SPP))の測定、外観の視診による評価、指尖毛細血管顕微鏡による指尖部毛細血管の状態の観察、およびdigital subtraction angiography (DSA)またはMR-angiographyによる血流の評価を行った。さらに、血清 VEGF、thrombospondin-1 (TSP-1)、IL-1 β 、FGF、およびendostatinの測定をELISA法により行った。

結果

移植した単核細胞数は平均 8.38×10^8 ($2.20 \times 10^8 \sim 19.5 \times 10^8$)、CD34陽性細胞数は 0.52×10^6 ($0.06 \times 10^6 \sim 1.91 \times 10^6$)であった(表1)。

疼痛、冷感、満足度に関するVASは、症例1～5で1年後、症例6で6ヶ月後に、治療前と比較して著明に改善していた(図1A)。なお、症例1と3では一旦低下した疼痛および冷感のVASが再上昇しているが、これはVASが上昇した時期と一致

表1 【症例のまとめ】

症例	1	2	3	4	5	6
治療肢	右手	両手	右手	右手・右足	左手・左足	右下腿
年齢	73	65	61	25	66	58
性別	男性	男性	男性	女性	男性	女性
原疾患	強皮症	強皮症	MCTD	強皮症	MPA	MPA
治療対象病変	虚血性潰瘍	末梢循環障害	虚血性潰瘍	虚血性潰瘍	壊疽	虚血性潰瘍
細胞の由来	末梢血単核球	末梢血単核球	末梢血単核球	末梢血単核球	末梢血単核球	末梢血単核球
移植細胞数	4回の平均	4回の平均	4回の平均	4回の平均	4回の平均	2回の平均
CD34陽性細胞	0.23×10^6	0.36×10^6	0.22×10^6	0.99×10^6	0.70×10^6	0.64×10^6
有効性	有効	有効	有効	著効	著効	著効
転帰	治癒	軽快	治癒	治癒	治癒	治癒
転帰までの期間	8ヵ月	1ヶ月	10ヵ月	7ヵ月	9ヵ月	4ヵ月
有害事象	なし	なし	なし	なし	なし	なし

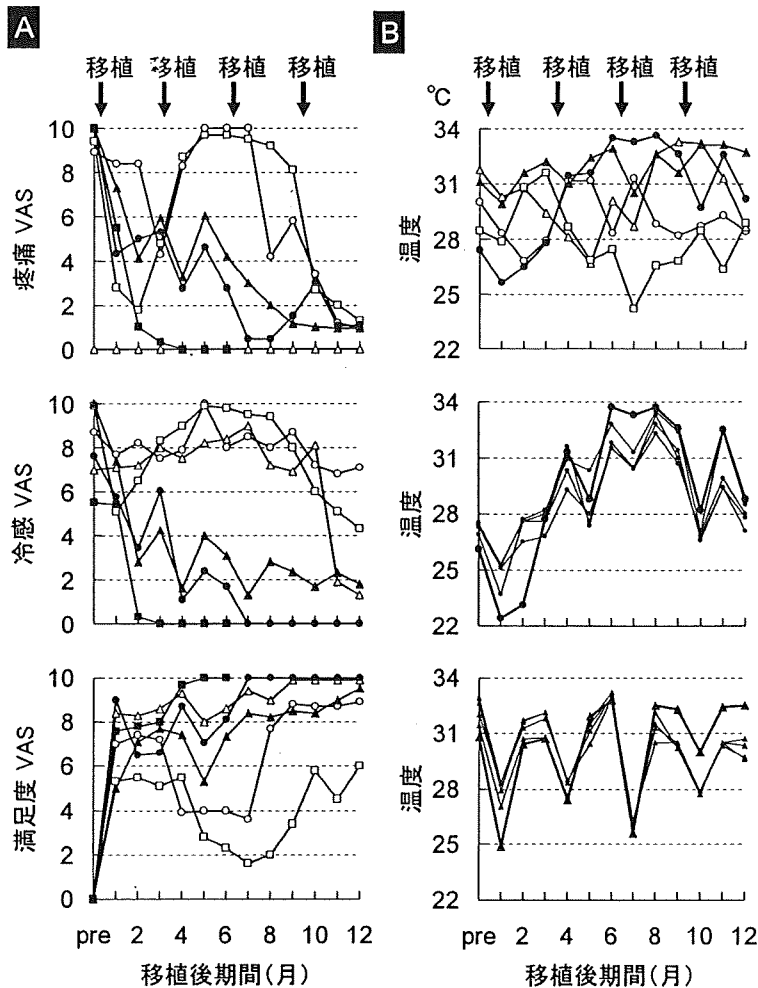


図 1

A は疼痛 (上段) /冷感 (中段) /満足度 (下段) の VAS の経時的変化を示す。痛みが強いほど、冷感が強いほど、および本治療に対する満足度が高いほど VAS 値は高値を示す。B はサーモグラフィーで測定した指 (または趾) 尖部皮膚表面温度の経時変化を示す。上段は、症例 1~5 で重点的に移植を行った手または足の 5 本の指趾の指尖部皮膚表面温度の平均値を示す。中段は症例 4 におけるサーモグラフィーで測定した 5 本の右足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趾尖部の表面温度を示す。下段は症例 5 におけるサーモグラフィーで測定した 5 本の左足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左足母趾の趾尖部の表面温度を示す。

○ : 症例 1、△ : 症例 2、□ : 症例 3、● : 症例 4、▲ : 症例 5、■ : 症例 6、●太点線 : 右足拇指、●点線 : 右足第 2-5 趾、▲太点線 : 左足拇指、▲点線 : 左足第 2-5 趾

して一度治りかけた潰瘍が再発したためである。

3ヶ月毎にサーモグラフィーにより測定した手指または足趾尖部皮膚表面温度は、症例1~3では、上昇、下降を繰り返し、一定の傾向は見られなかったが、症例4、5では上昇傾向を示し、症例4では1年後に治療前と比較して2.8℃の温度上昇がみられた (図1B上段)。また、症例4では深掘れ潰瘍を有する右足拇趾、症例5では潰瘍と壊死を有する左足拇趾の温度が治療前他の4趾 (点線) と比較して最も低温であったが、重点的に単核細胞の移植を行った結果、1年後にはこれらの趾が他の4趾 (点線) と比較して最も温度が高くなっていった (図1B中段および下段)。

ABIは、症例4と5で測定した。症例4では潰瘍の無い左側では正常であったのに対して、足趾に潰瘍が2ヶ所みられた右側では治療前0.78と低下していた。しかし、第1回目の移植から

1ヶ月後には右側のABIは1.00に上昇しており、その後低下することはなかった。症例5では、治療前から左右差は無くABIは正常であった。

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70mmHgと低下していたが、移植半年後には79mmHg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、1年後評価の時点で2ヶ所とも完全に上皮化し治癒していた。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、1年後評価の時点で白色化は消失していた。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、1年後評価の時点で2ヶ所とも完全に上皮化し治癒していた。症例4では、治療前右足拇趾尖 (図2A) および環趾尖に1ヶ所ずつ、右手示指近位指節間関節に1ヶ所 (図2C)、難治性の潰瘍が見られていた。移植半年後には右手示指近位指節間関節の潰瘍

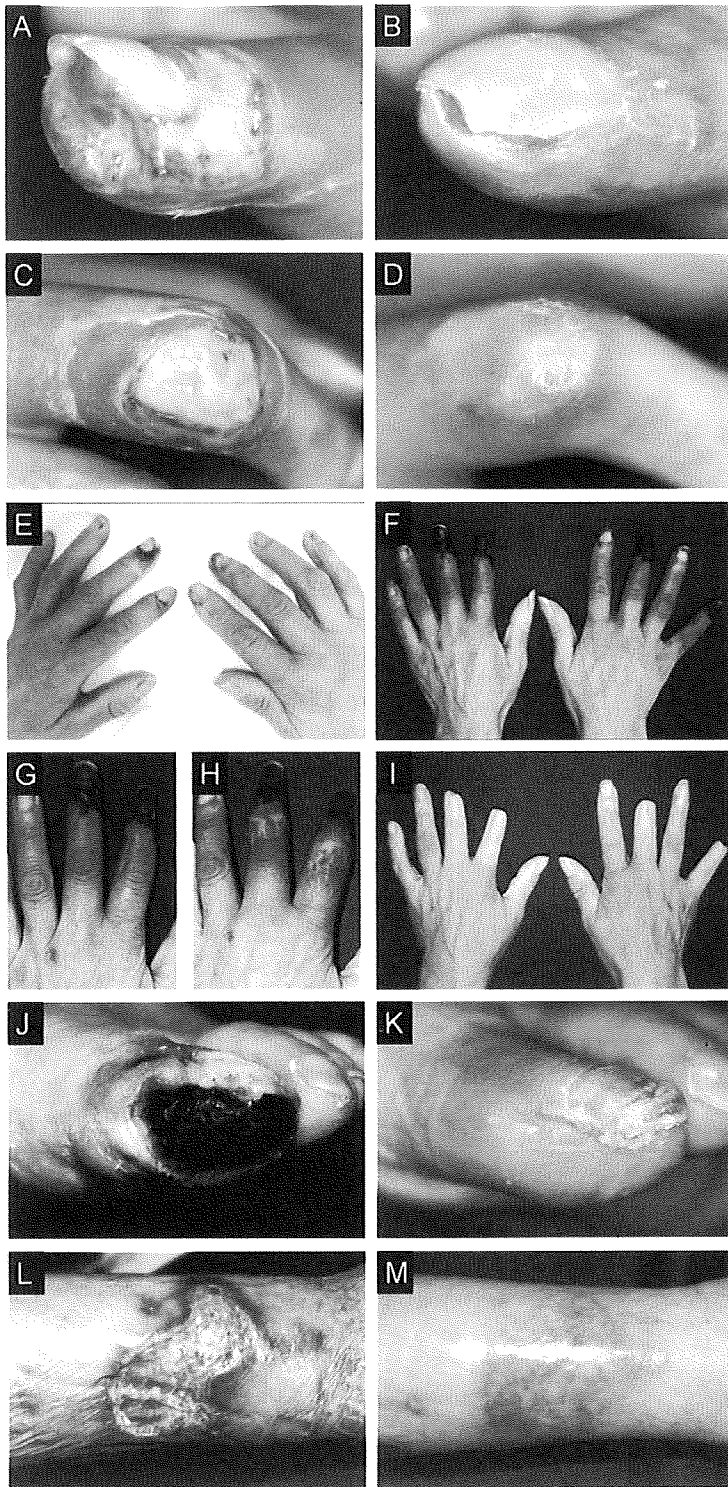


図 2

治療前に見られた潰瘍および治療後の同部位の状態を示した写真を示す。

Aは症例4の治療前の右足母趾の趾尖潰瘍を示す。

Bは治療1年後の同部位を示す。

Cは症例4の治療前の右手示指PIP関節の潰瘍を示す。

Dは治療6ヶ月後の同部位を示す。

Eは治療開始2ヶ月前の両手指尖潰瘍の状態を示す。

Fは治療開始直前に同潰瘍が進行し手指が壊死した状態を示す。

Gは治療前の左手示指と中指を示す。

Hは治療2週間後の同指が腫脹した状態を示す。

Iは治療1年後の改善した両手指の状態を示す。

Jは症例5の治療前の左足母趾の趾尖潰瘍および壊死を示す。

Kは治療1年後の同部位を示す。

Lは症例6の治療前の右下腿外側の潰瘍を示す。

Mは治療4ヶ月後の同部位を示す。

(図2D) および右足環趾尖の潰瘍は完全に上皮化し、1年後評価の時点で右足母趾尖の深掘れ潰瘍も完全に上皮化し治癒していた(図2B)。症例5では、治療前左手示指および中指に2カ所、右手拇指尖、中指尖および小指尖に3カ所(図2E, F)、さらに左足母趾尖(図2J)に1カ所壊死が見られていた。移植前は免疫抑制薬、prostaglandin製剤などの血管拡張薬を投与したに

もかかわらず壊死は進行し続けていた。しかし、移植後壊死の進行は停止した。また、移植2週間後には、移植を行った手指に血流改善を示唆する著明な腫脹が見られた(図2G, H)。半年後までに左手示指と左手中指の壊死部は自然に脱落し、1年後には壊死部脱落後の指尖部は完全に上皮化した(図2I)。また、左足母趾尖の壊死部は自然に脱落し、壊死部より深層にあった潰

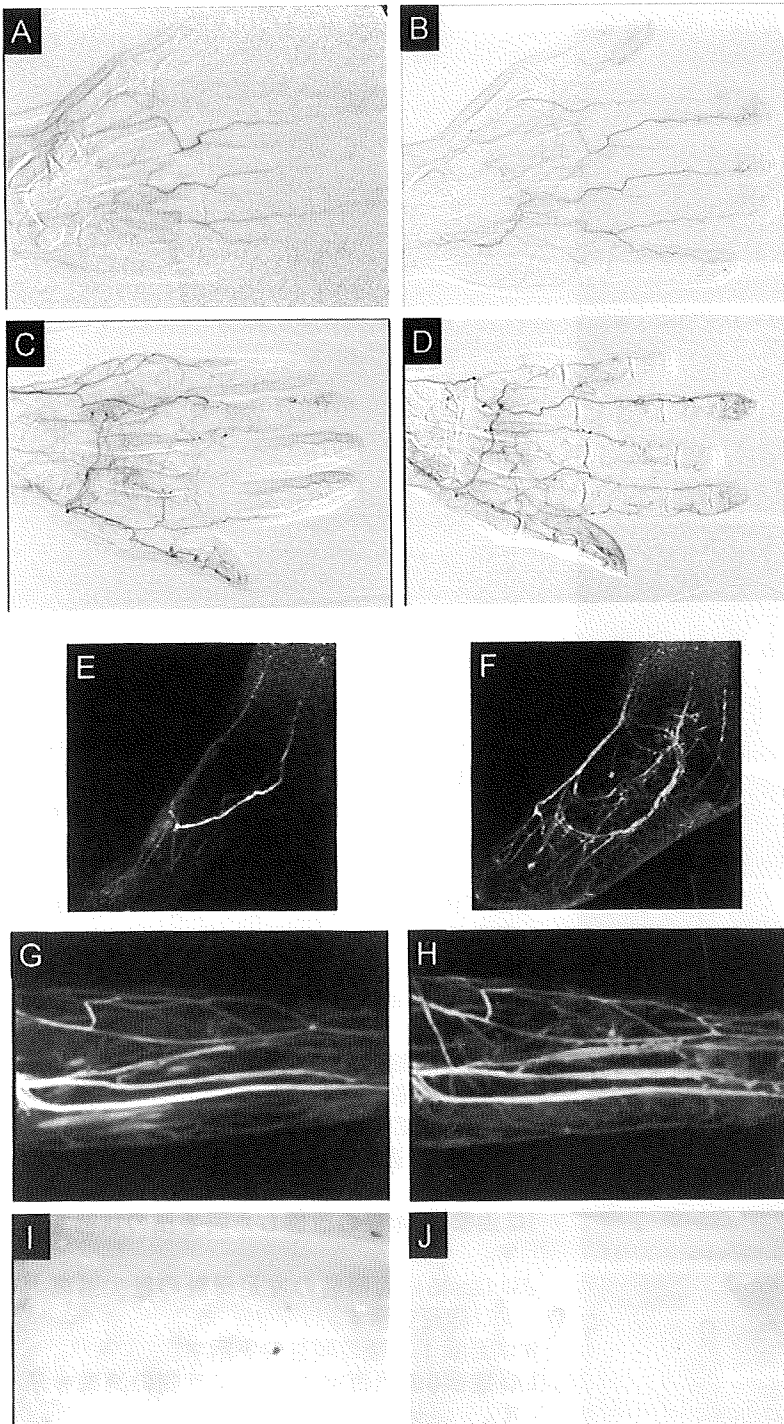


図 3

治療前後で血流が改善した状態を示す。
 Aは症例2の治療前の左手のDSA像を示す。
 Bは治療1年後の同部位のDSA像を示す。
 Cは症例5の治療前の右手のDSA像を示す。
 Dは治療1年後の同部位のDSA像を示す。
 Eは症例4の治療前の右足のMR-Angiography像を示す。
 Fは治療1年後の同部位の右下腿のMR-Angiography像を示す。
 Hは治療3ヶ月後の同部位のMR-Angiography像を示す。
 Iは症例5の治療前の左環指の指尖毛細血管顕微鏡写真を示す。
 Jは1年後の同部位の指尖毛細血管顕微鏡写真を示す。

瘍も治癒し上皮化していた(図2K)。症例6では、治療前右下腿外側に進行性の深掘れ潰瘍がみられていたが(図2L)、移植4ヶ月後には肉芽組織の隆起と上皮化を認め治癒していた(図2M)。

症例1, 2, 3, 5はDSAにより、症例4, 6はMR-angiographyにより、治療前と1年後に可視血管の評価を行ったところ、単核細胞移植を重点的に行った症例2の左手および症例5の右手で描出される血管が増加していた(図3A-D)。また、症例4の右足および症例6の右下腿で描出される血管が増加していた(図3E-H)。

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(図3I)、移植半年後の時点で観察可能となっていた(図3J)。

血清学的には、血清VEGF、TSP-1、IL-1 β 、FGF、およびendostatin濃度の測定を行った。血清VEGF濃度は、症例2, 3, 5, 6では移植1ヵ月後、症例4は移植2ヶ月後、症例1は移植3ヵ月後にピークを示した。また、すべての症例で移植前よりも移植後にVEGF濃度は増加を示した(図4A)。症例4について、単核細胞採取前後

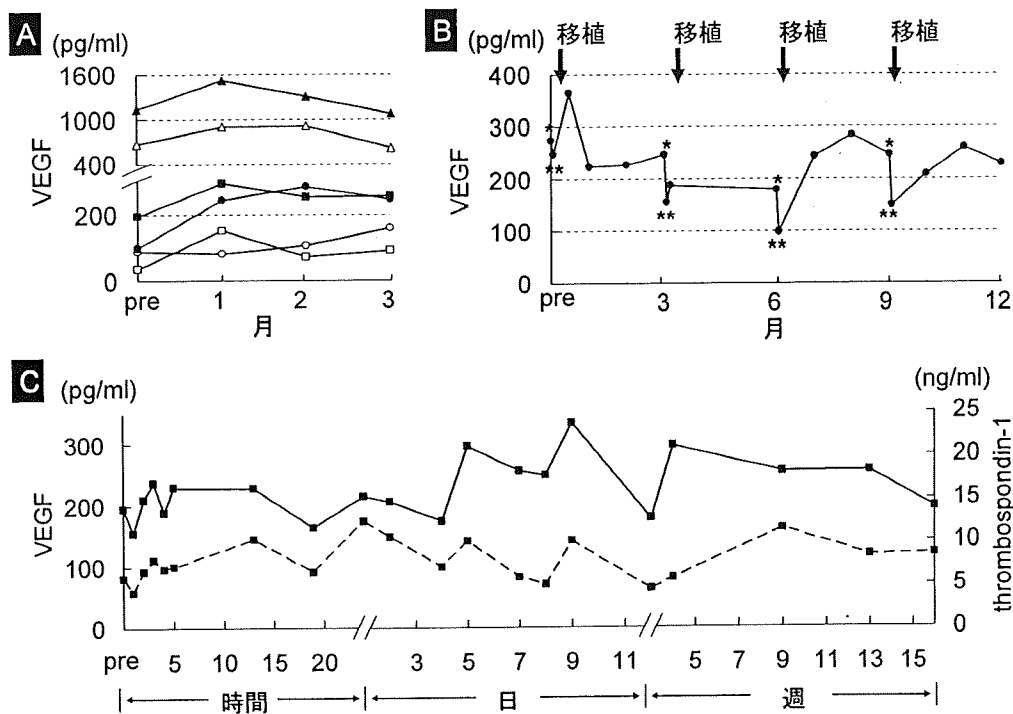


図 4

A は症例1~6の移植前および移植後3カ月間の血清 VEGF 値の経時変化を示す。B は症例4の移植前、移植直後の血清 VEGF 値を含め12カ月間の血清 VEGF 値の経時変化を示す。C は症例6の移植前から移植後3カ月後までの血清 VEGF 値と血清 thrombospondin-1 値の相関関係を示す。

*：末梢血採取直前、**：末梢血採取直後、○：症例1、△：症例2、□：症例3、●：症例4、

▲：症例5、■：症例6、■点線：症例6 thrombospondin-1

および移植後短期間の血清VEGF濃度を調べたところ、単核細胞採取前（図中*）と比較して、単核細胞採取後（図中**）に常に低下しており、移植後早期に再上昇し、3ヵ月後には低下するという傾向がみられた（図4B）。他の症例でも、単核細胞採取前と比較して採取後の血清VEGF濃度は、平均約30%減少していた。症例6でVEGFおよびTSP-1濃度をより短い期間ごとに測定した結果、統計学的有意差は得られなかったが、単核細胞移植後1日までの時間単位、1日~1ヵ月までの日単位では両者の変動は相関しており、1ヵ月以降の週単位では両者は逆相関していた（図4C）。血清IL-1 β 、FGF濃度は移植前、移植後ともに全て感度以下であった。血清endostatin濃度は、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。

移植した単核細胞数やCD34陽性細胞数と、VAS、サーモグラフィー、血清学的データなどとの間に、一定の相関関係を見出すことはでき

なかった。

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週間程経過したと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。特に症例5では、移植から約2週間後に手指の腫脹が見られた。これは、著しく低下していた血流が、単核細胞分画の移植を行うことで血管拡張が起こり、血流が増加したことによって起こった徴候と考えられた。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局所で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4~6は経過中に潰瘍の大きな悪化や再発することなく、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ヵ月程経過した頃から改善が見られた。症例4~6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4~6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4~6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。具体的には、症例1~6で移植した単核細胞数の平均は、それぞれ6.17, 7.84, 4.25, 13.78, 9.34, および 8.89×10^8 個であり、症例1, 3で移植した単核細胞数の平均よりも症例4~6で移植した単核細胞数の平均の方が約2倍多かった。CD34陽性細胞についても、症例1~6で移植したCD34陽性細胞数の平均は、それぞれ0.23, 0.36, 0.22, 0.99, 0.70, および 0.64×10^6 個であり、症例1, 3で移植したCD34陽性細胞数の平均よりも、症例4~6で移植したCD34陽性細胞数の平均の方が約3.5倍多かった。VASと細胞数の関係からみると、再発をきたした症例1と3においては、CD34陽性細胞数よりは単核細胞数の方がVASと相関しており、単核細胞数で約 5×10^8 個が再発の有無の境界になっていた。

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ていた右拇趾、および症例5の潰瘍ないし壊死がみられていた左拇趾は、移植前5本の趾の中で最も温度が低かったにも関わらず、1年後には5本の趾の中で最も温度が高くなっていた。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り、移植する単核細胞数またはCD34陽性細胞数は一定のレベルよりも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、これも治療前下肢の血流低下が移植後に改善したことを反映しているものと考えられた。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に伴う灌流圧の上昇を反映しているものと考えられた。

症例2,5のDSA、症例4, 6のMR-Angiography、症例5の指尖毛細血管顕微鏡で、治療前と比較して治療後に明らかに可視血管の増加が見られた。このような長期効果は、単核細胞分画移植に伴う血管拡張効果に加えて、angiogenesisによる血管新生が起こったためと考えられた。

血清 VEGF 濃度に関しては、症例4で末梢血単核細胞分画採取後に血清VEGF濃度は一旦低下し、移植後早期（多くは2週以内）に増加し、3ヵ月後には元に戻るといった傾向がみられた。これは、末梢血単核細胞分画採取により、末梢血中で VEGF を産生する単核細胞数が急激に減少するため血清 VEGF 濃度が低下したものと考えられた。移植によって単核細胞を筋肉内または骨膜下に移植することにより、移植された単核細胞から組織中へ産生された VEGF が、末梢血液中に流入することにより、移植後の血清VEGF濃度は再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、移植された単核細胞から産生される VEGFは次第に減少し、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。なお、移植された単核細胞から産生される多岐にわたるサイトカインにより血液中の単核細胞が活性化されるため、血中 VEGF 濃度は、移植された単核細胞の寿命である数週間より長い数ヵ月の期間にわたって高値を示すものと考えられた。

TSP-1は、1971年に Baenzinger らによって発見されたmatricellular glycoproteinである(11)。TSP-1は、血小板 α 顆粒に存在しており、血小板以外でも血管内皮細胞、単球、マクロファージ、線維芽細胞、平滑筋細胞、各種癌細胞などで産生が確認されている(12, 13)。TSP-1の血管新生における役割は多数の報告があり、多くはTSP-1を血管新生抑制因子として位置付けている(14, 15)。しかし、一方ではTSP-1による血管

新生促進作用も報告されており(16, 17)、TSP-1による血管新生に対する正確な作用はいまだ不明な部分が多い。また、TSP-1は組織の修復に関与しているとの報告もある(18)。症例6で移植後時間単位、日単位、週単位で血清VEGF濃度と血清TSP-1濃度を測定したところ、各々の濃度はともに増加と減少を繰り返し、一定の傾向は見られなかった。しかし、移植後1カ月までの期間においては、両者の濃度変化は相関しており、1ヶ月以降の濃度変化は統計学的には有意ではないが逆相関する関係が見られた。この関係から移植後早期は、移植した単核細胞から産生されたVEGF、TSP-1ともに短期的には創部では血管新生よりも主に組織の修復に関与したため、VEGFがTSP-1を抑制することなく両者の濃度はparallelに推移したと考えられた。これは、創傷受傷後3週間後の創部におけるTSP-1濃度が上昇していたという報告から(19)、創部におけるTSP-1は、短期的には主に創傷治癒に働くのではないかと考えられた。その後、数週間で局所に移植された単核細胞の寿命が来てVEGFとTSP-1の新たな産生がなくなると、短期的な組織修復作用がなくなる。その後は、移植された単核細胞から産生されるサイトカインによって活性化されていた血中単核細胞から産生されるVEGFによる血管新生促進作用が主となり、血管新生抑制作用を有するTSP-1は抑制され、長期的にはinversive parallelな関係を示すようになったのではないかと考えられた。VEGFの半減期は約3分間と短い(20)。これに対してTSP-1の半減期はおよそ数時間と比較的長い(21)。もし、両者の半減期が同じであり、かつ同じ作用で働き続けるとすれば、両者は永久にparallelな関係を示すはずであるが、両者の半減期に差があり、かつ血管新生促進と抑制という逆の作用で働くようになったため、本例のようにinversive parallelな濃度変化を示すようになったものと考えられた。

安全性については移植直後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
 11. Baenziger NL, Brodie G N, Majerus PW. A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 4: 240-243; 1971
 12. Jaffe EA, Ruggiero JT, Falcone DJ. Monocytes and macrophages synthesize and secrete thrombospondin. *Blood* 65: 79-84, 1985
 13. Raugi GJ, Mumby SM, Abbott-Brown D, Bornstein P. Thrombospondin: synthesis and secretion by cells in culture. *J Cell Biol* 95: 351-354; 1982
 14. Tolsma SS, Volpert OV, Good DJ, Frazier WA, Polverini PJ, Bouck N. Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *J Cell Biol* 122: 497-511; 1993
 15. Iruela-Arispe ML, Porter P, Bornstein P, Sage EH. Thrombospondin-1, an inhibitor of angiogenesis, is regulated by progesterone in the human endometrium. *J Clin Invest* 97: 403-412; 1996
 16. Tuszynski GP, Rothman VL, Deutch AH, Hamilton BK, Eyal J. Biological activities of peptides and peptide analogues derived from common sequences present in thrombospondin, properdin, and malarial proteins. *J Cell Biol* 116: 209-217; 1992
 17. Quian X, Wang TN, Rothman VL, Nicosia RF, Tuszynski GP. Thrombospondin-1 modulates angiogenesis in vitro by upregulation of matrix metalloprotease-9 in endothelial cells. *Exp Cell Res* 235: 403-412; 1997
 18. Reed MJ, Puolakkainen P, Lane TF, Dickerson D, Bornstein P, Sage EH. Differential expression of SPARC and thrombospondin 1 in wound repair: immunolocalization and in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 41: 1467-1477; 1993
 19. Oh JY, Kim MK, Shin MS, Lee HJ, Ko JH, Wee WR, Lee JH. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. *Stem Cells* 26: 1047-55; 2008
 20. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1: 27-31; 1995
 21. Dawes J, Clemetson KJ, Gogstad GO, McGregor J, Clezardin P, Prowse CV, Pepper DS. A radioimmunoassay for thrombospondin, used in a comparative study of thrombospondin, beta-thromboglobulin and platelet factor 4 in healthy volunteers. *Tromb Res* 29: 569-81; 1983

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
信州大学医学部心臓血管外科¹、循環器内科²、輸血部³

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年度の本学会議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は骨髄に由来する内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell: 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Kalka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、ウサギ骨髄単核球細胞(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髄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例に対し自己骨髄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髄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

自己骨髄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ヵ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髄細胞移植の適応

- ・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ヵ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髄細胞移植による血管新生療法を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、両側の腸骨より骨髄液を約600ml採取した。この時、細胞分析用に骨髄液3mlをベノジェクト[®]DK[Terumo, Japan]真空採血管を用い保存した。採取した骨髄液を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（ 10^8 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A)。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B)。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C)。

図DにBuerger病16症例、図E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F)。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1例、Behcet病1例、Buerger病にて移植後一

図A 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B 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C 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	

図D 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→治愈傾向	effective	

図E 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

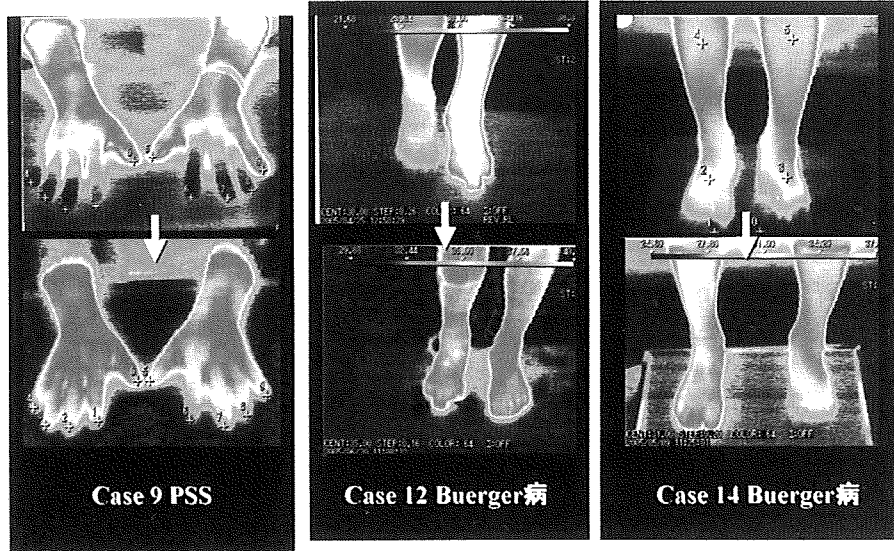
図F 奏効率におよぼす要因

	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%)

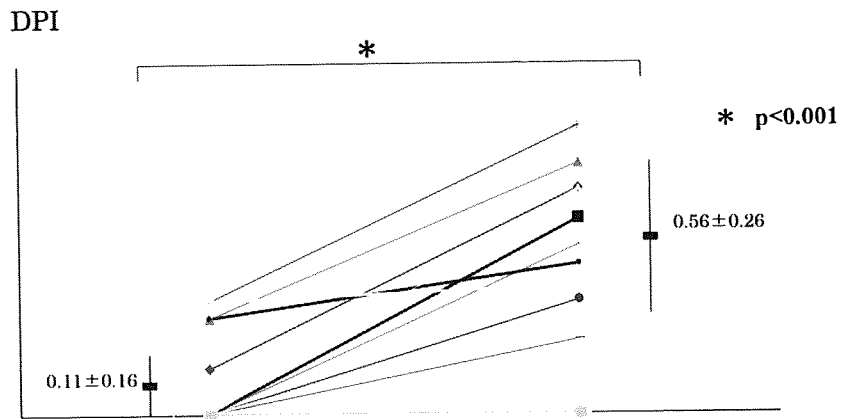
図G 無効例7例の検討

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

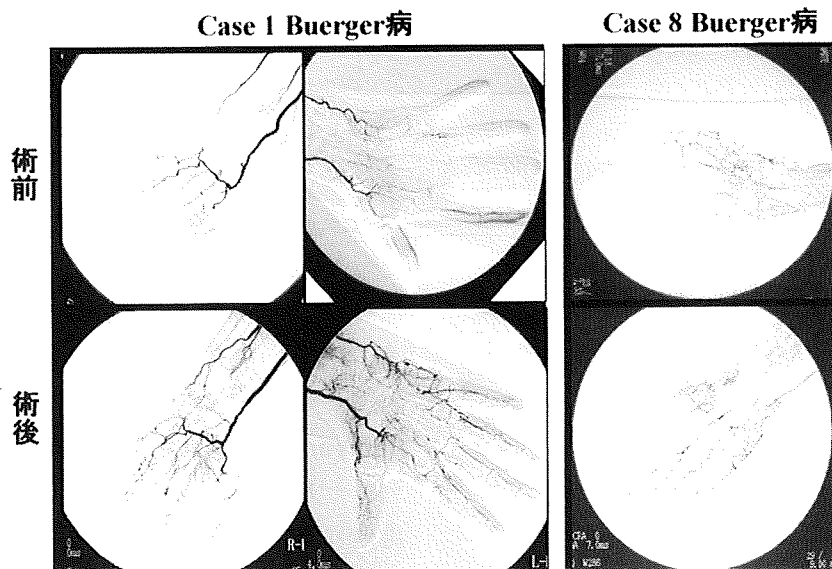
☒H Thermography



☒I Digital / brachial pressure index (DPI)



☒J DSA



図K 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%)

図L 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

図M 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

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G)。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

ィーで改善が認められた症例は68% (図H)、DPIでは45% (図I)、DSAでは41% (図J)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(図K)。

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L)。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M)。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。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、本人の治療希望が強く、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G-CSF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、外科的血行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、症状と最も関連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も有効な治療選択肢となるものと考えられる。

平成19-21年度は、重ねた臨床症例の報告とともに、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

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600ml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 $3\sim 5\times 10^9$ 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。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と骨髄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、骨髄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50ナイロン糸〔株式会社アズウェル〕にて縫合した。

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、MoorLDI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、5mlシリンジ、Terumo〕を刺し、適量のPBS(-/-)〔GIBCO〕を流し込み、ディッシュにあけ、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、KHCO₃0.5g、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(血管説切除部周辺)6ヶ所に注射器〔マイジェクター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。

骨髓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群を作製した。

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1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群は分離された骨髓単核球細胞(1 \times 10⁶ cell/250 μ L)を虚血作製1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1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、1日後に骨髓細胞(4 \times 10⁶ 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)。

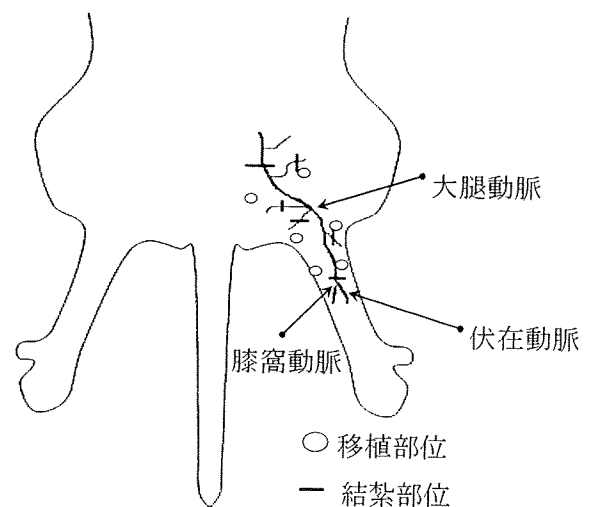


図1. マウス下肢虚血モデルの作製