

## 慢性膵炎に対する体外衝撃波治療

研究分担者 下瀬川 徹 東北大学大学院医学系研究科消化器病態学・教授  
研究分担者 廣田 衛久 東北大学病院消化器内科・助教

### 研究要旨

慢性膵炎は非可逆生進行性の疾患であり、終末期には膵内外分泌不全となり、膵性糖尿病を発病し著しく生活の質（QOL）が障害される。その病態には、膵組織の虚血が関与していると推測されている。本研究では慢性膵炎自然発症ラットを用いて、低出力体外衝撃波治療による膵組織の変化をin vivoで検証するとともに、膵血流をヒトで測定可能なPerfusion CTによる解析法を用いて慢性膵炎患者の膵血流を測定した。その結果、ラットにおいては今回行った低出力衝撃波治療では膵組織の血管密度や線維化に変化がなかったが、膵への炎症性変化も認めなかった。慢性膵炎患者の膵血流解析では、確かに健常膵と比較して血流の低下を認めた。

### A. 研究目的

慢性膵炎は非可逆生進行性の疾患であり、終末期には膵内外分泌不全となり、消化吸収障害や、膵性糖尿病を発病し著しく生活の質（QOL）が障害される。原因についてはアルコール多飲などの環境要因とともに、何らかの遺伝的素因が強く関与すると考えられているが、未だに良く分かっていない。有病患者数は人口10万人あたり36.9人で徐々に増加傾向である。自覚症状として難治性腹痛を認めることが多く、薬物治療（消化酵素剤、鎮痛薬、麻薬など）、内視鏡治療、外科治療などが試みられているが未だ満足できる治療成績に至っていない。

研究代表者の下川らは、低出力の衝撃波を体外から虚血組織に照射すると、血管新生が促進されることを報告した。そして、ブタ慢性虚血モデル、狭心症患者、ブタ急性心筋梗塞モデル、ウサギ下肢虚血モデルにおいて、低出力体外衝撃波治療が、組織血流を改善することを報告している。

慢性膵炎の病態の一部には、膵組織の虚血が関与することが広く知られていることから、この虚血が疼痛や内分泌障害（内分泌細胞の脱落）に関与する可能性がある。本研究では、低出力体外衝撃波治療を慢性膵炎に応用し、組織の虚血を改善することにより、特に内分泌障害を改善させることができないか動物モデルを用いて検討することを目的とする。

また、現在まで膵血流の定量的な評価法に対する報告は少なく、その確立は必須である。膵Perfusion CTは既に臨床応用されているが、現在のところ主に膵腫瘍の血流評価に限定されて用いられており、膵血流と膵内外分泌機能の相

関を検討した報告はなされていない。我々は、Perfusion CTを用いて膵血流の定量的な評価法を確立し、かつ膵炎に伴う膵血流の変化や、膵機能との関係についても検討を行う。

### B. 研究方法

慢性膵炎とそれに伴う糖尿病を自然発症するWister系Bonn/Kobori (WBN/Kob) ラットを用いる。このラットは雄のみに100%の頻度で慢性膵炎が発症し、2ヵ月齢の時点で膵組織の虚血、膵管の慢性膵炎による変化を起こし、生後9ヵ月までに全ての雄WBN/Kobラットは糖尿病を発症する。2ヵ月齢のWBN/Kobラットに対して、ペントバルビタール腹腔内投与による麻酔下に、3週おきに週3回低出力衝撃波を2000発、膵臓に照射する。対照群では麻酔のみを行い、衝撃波治療は行わない（衝撃波治療群、対照群、各n=10）。これを1年間継続し9~14ヵ月齢まで行う。その間、1ヵ月に1回治療時に採血を行い、血糖値、IRI（血中インスリン濃度）を測定する。さらに、安楽死させた後、組織をサンプリングし、組織学的・生化学的検討を行う。

膵Perfusion CTに用いたCT装置はSiemens社製のSomatome Definition、64列MDCT。解析法はOne Compartment法により、パラメーターとして $F_v$ 値（pancreatic volumetric blood flow）、 $V_d$ 値（pancreatic volume of distribution）、 $\tau$ 値（blood transit time）を検討する。膵外分泌機能はPFD試験を用い、膵内分泌機能はグルカゴン負荷試験により評価した。対象は膵炎患者とした。

また、WBN/kobラットの衝撃波治療前後でラット膵のPerfusion CTを行って、血流改善の評価を行う。

(倫理面への配慮)

本研究は、東北大学動物実験専門委員会の承認を得た上で、実験動物に対する十分な動物愛護上の配慮の下、実験を行っている。膵炎患者に対する膵Perfusion CTによる血流評価は東北大学倫理委員会の承認を得て行っており、患者に十分な説明を行い、同意を得て行っている。

### C. 研究結果

衝撃波治療群と対照群のいずれの群においても、5ヵ月齢から死亡例が増加し、7ヵ月齢までに全例死亡した。血糖値、血中インスリン、リパーゼ、トリプシンの値に両群間で差を認めなかった。組織学的な検討を行ったが、腺房細胞や膵島細胞の委縮、線維化の程度に両群間で差は認めなかった。組織学的に衝撃波により膵炎が悪化した症例は認めなかった。

膵臓に慢性の炎症細胞浸潤と線維化が認められる、自己免疫性膵炎患者11名に対して膵Perfusion CTを行った。自己免疫性膵炎患者では、67%(6/9)の患者に膵外分泌障害を認め、27%(3/11)の患者に糖尿病を認めた。自己免疫性膵炎患者では、対照群と比較し有意にFv値が低下していた。また、慢性膵炎患者23名に同様にPerfusion CTを行い、膵血流を測定した。早期慢性膵炎患者4名と肝性膵炎確定症例19名を比較すると、有意に早期慢性膵炎患者においてFv値が高かった(81.8/min vs 166.6/min,  $p < 0.0001$ )。膵外分泌機能を表すPFD値が70%未満の膵外分泌障害患者においてFv値は71.8/min、70%以上の膵外分泌機能が保たれた慢性膵炎患者ではFv値は142.8/minと両群間に有意差を認めた( $p = 0.01$ )。さらに、Fv値とPFD値の間にはPearson相関係数 $r = 0.6080$ ,  $p = 0.0074$ と有意な相関関係を認めた。また、糖尿病がある慢性膵炎患者ではFv値が平均73.1/min、それに対し糖尿病を合併する慢性膵炎患者ではFv値が平均121.4/minと高い傾向であった( $p = 0.051$ )。

### D. 考察

衝撃波治療を行わなかった対照群においても死亡率が高かったことから、頻回の麻酔が負荷になった可能性が考えられた。一方、血中膵酵素の増加を認めなかったことと組織学的検討から、今回用いた低出力の衝撃波は、膵実質の破壊を起こさない安全な出力と考えられた。

Perfusion CTを用いた慢性膵炎患者に対する膵血流解析の結果より、血流と膵機能の相関は明らかであり、慢性膵炎の進行に伴い血流が低下し、膵機能も低下することが明らかとなった。血流を回復させることで、膵機能が回復するかは今後明

らかにされるべき課題である。

今後より良い動物モデルを用いることにより低出力衝撃波による膵血流の変化を観察することが臨床応用のために必要である。

### E. 結論

慢性膵炎は進行に伴い、慢性膵炎に対する低出力体外衝撃波治療の有効性については、さらなる検討を要する。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

① Hirota M, Tsuda M, Tsuji Y, Kanno A, Kikuta K, Kume K, Hamada S, Unno J, Ito H, Ariga H, Chiba T, Masamune A, Satoh K, Shimosegawa T. Perfusion computed tomography findings of autoimmune pancreatitis. *Pancreas*. 49;1295-1301, 2011.

#### 2. 学会発表

- ② 廣田衛久, 下瀬川：早期慢性膵炎の膵血流解析と膵機能。  
第42回日本膵臓学会大会(2011年7月29-30日, 弘前)
- ③ 廣田衛久, 下瀬川徹：慢性膵炎の膵血流解析と膵機能。  
第3回膵Perfusion CT画像研究会。(2012年4月18日, 東京)

### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 脊髄損傷に対する体外衝撃波治療

研究分担者 井樋 栄二 東北大学大学院医学系研究科整形外科学・教授  
研究分担者 小澤 浩司 東北大学大学院医学系研究科整形外科学・准教授

### 研究要旨

脊髄損傷は、最初の物理的損傷（一次損傷）の後に損傷が拡大し（二次損傷）、傷害が広がる。二次損傷を引き起こす原因は、炎症性細胞の浸潤や組織の虚血により、周囲の細胞まで壊死やアポトーシスを来すことと考えられている。

今回我々は、ラットを用い損傷脊髄に体外低出力衝撃波を照射することにより、VEGFを中心とした血管増殖因子や神経栄養因子が産生され、損傷脊髄の二次傷害を防ぎ、神経の回復が促されるか検討した。その結果、体外低出力衝撃波治療により、有意に良好な麻痺の改善と血管新生因子であるVEGFと受容体Flt-1、神経栄養因子であるBDNFと受容体TrkBが早期に上昇することがみとめられた。体外低出力衝撃波治療は現在有効な治療法が確立されていない脊髄損傷に対し、新たな治療法となることが期待できる。

### A. 研究目的

脊髄損傷後の脊髄障害は、直接的外力（一次傷害）によって生じる脊髄組織の挫傷、出血性壊死とその後の虚血、生化学的変化、病理学的変化（二次傷害）によって生じるアポトーシスを含む遅発性の細胞死により引き起こされる。

下川らは低出力の衝撃波を用いた体外衝撃波治療により、ブタ慢性心筋虚血モデル、ブタ急性心筋梗塞モデル、ウサギ慢性下肢虚血モデルにおいて虚血組織における毛細血管数および血流の有意な増加とVEGFなど様々なサイトカインの産生により心筋血流の改善、心機能の改善、下肢血流の改善を認めたと報告した。

これまで脊髄損傷に対する低出力体外衝撃波は試みられた事はなく、その効果は不明である。

近年、VEGFは血管増殖因子だけでなく神経増殖因子、神経栄養因子、神経保護因子としての働きが報告され注目されている。

我々は損傷脊髄に体外低出力衝撃波を照射することにより、VEGFを中心とした血管増殖因子や神経栄養因子が産生され、損傷脊髄の二次傷害を防ぎ、神経の再生に繋がるのではないかと仮説を立てた。

### B. 研究方法

SDラットの第9-11胸椎椎弓を切除し、重錘落下装置(NYU Impactor)を用いて第10胸椎高位で脊髄損傷を作製した。Sham群、Sham-衝撃波群

(Sham-SW群)、脊髄損傷群(SCI群)と脊髄損傷-衝撃波照射群(SCI-SW群)の4群に分け、Sham-SW群とSCI-SW群は損傷脊髄部位に低出力衝撃波を照射した(図1, 2)。条件はNishidaらの虚血心筋への方法を参照し、0.10mJ/mm<sup>2</sup>, 4Hz, 200shot/spot, 2spot, 週3回, 3週間とした。損傷後1, 7, 14, 21, 28, 35, 42日でBBB scoreを用いて下肢機能を評価した(各群n=6)。損傷後7, 21日の時点で各群の脊髄組織を取り出しRT-PCRを用いて血管新生因子であるVEGFとその受容体Flt-1、神経栄養因子であるBDNFとその受容体TrkBのそれぞれのmRNAを調べた。

衝撃波の強度・頻度・期間に関しては、これまでの下川らの基礎的実験および本実験の予備実験において決定した。

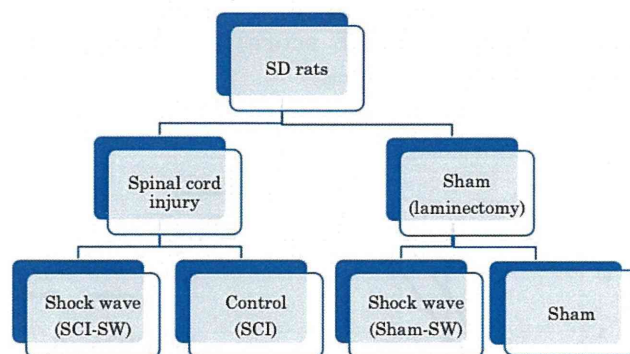


図1. 雌のSD rat(体重250-300g)を46匹使用した。無作為に以下の4群に分けた。

(1) SCI-SW group (shock wave applied after SCI)

- (2) SCI group (no shock wave after SCI)
- (3) Sham-SW group (shock wave applied after laminectomy)
- (4) Sham group (laminectomy only)

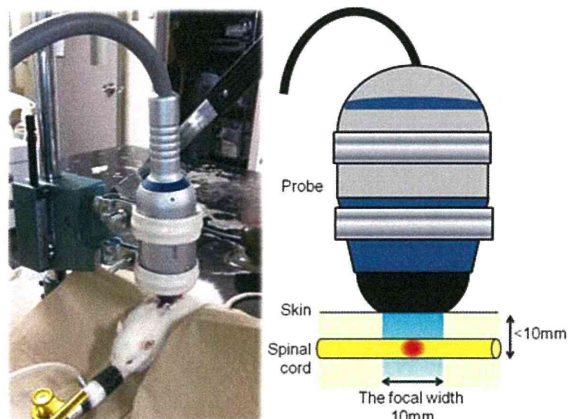


図2. 低出力衝撃波照射時の様子. 衝撃波装置のProbeの位置は特殊な固定装置により調整可能である.

### C. 研究結果

#### ① 下肢機能評価

Sham群とSham-SW群はBBB scoreが満点で麻痺は認められなかった(図3). SCI群とSCI-SW群は損傷後21日までは有意差がなかったが, 損傷後28, 35, 42日でSCI-SW群に良好な回復を認めた( $P < 0.05$ ). 損傷後42日のscoreはSCI群が $13 \pm 0.9$ 点, SCI-SW群 $17 \pm 1.5$ 点であった(図4).

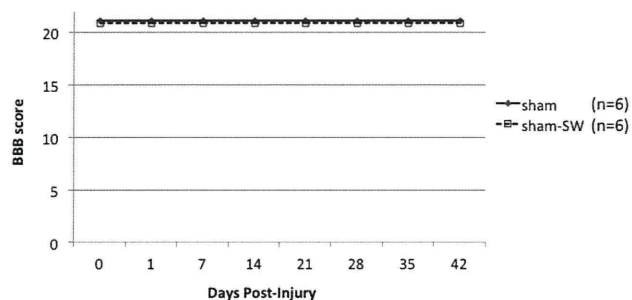


図3. 下肢機能評価(BBB score)の比較. sham群とsham-SW群各群ともにn=6.

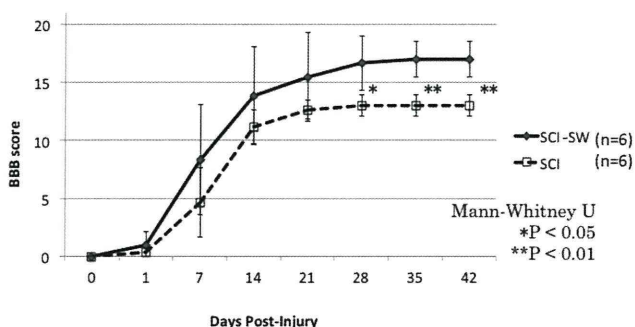


図4. 下肢機能評価(BBB score)の比較. SCI群とSCI-SW群各群ともにn=6.

#### ② 遺伝子的検討

Sham-SW群はSham群に比べ損傷後7日でVEGF, Flt-1, BDNFのmRNAが有意に上昇した. 損傷後7日でSCI群ではsham群に比較しVEGF, Flt-1, BDNF, TrkBのmRNAが有意に低下し, SCI-SW群ではSCI群に比べ全て有意に上昇していた( $P < 0.05$ ). VEGF, Flt-1, BDNF, TrkBのmRNAは損傷後21日で7日に比べ上昇を認めたが, SCI群とSCI-SW群間に有意差は認めなかった(図5).

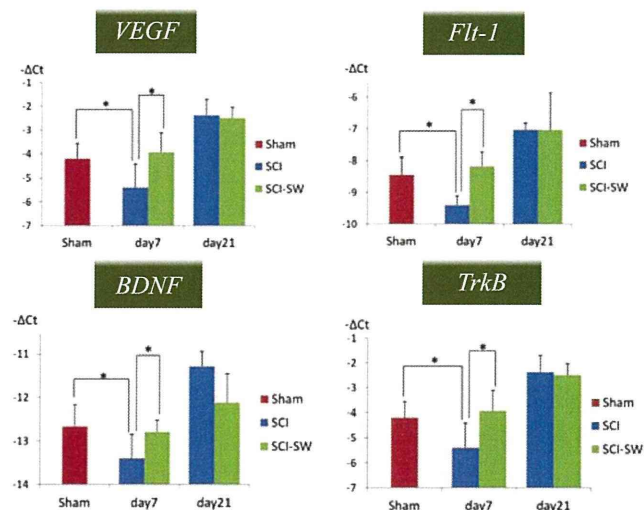
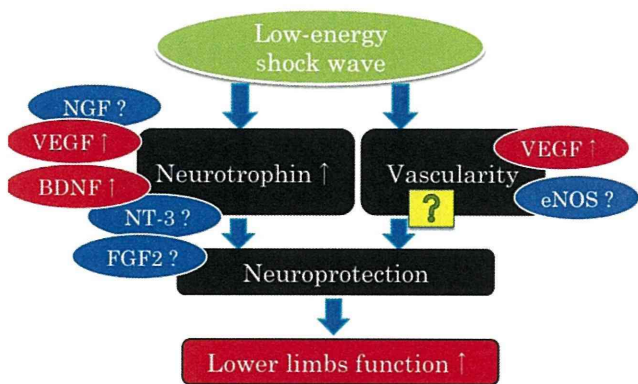


図5. VEGF、Flt-1(VEGFの受容体)、BDNF、trk-B(BDNFの受容体)のmRNAの発現. Error barは標準偏差. \* $p < 0.05$

### D. 考察

低出力体外衝撃波は非損傷脊髄の下肢機能を悪化させることはなく、脊髄損傷後の下肢機能回復には有効であることが本研究で明らかになった. 脊髄損傷に衝撃波を照射した群では損傷後7日目の急性期でVEGFとBDNFおよびそれぞれの受容体が有意に上昇していることから、急性期で不足した血管新生因子や神経栄養因子の発現を低出力衝撃波が誘導することにより下肢機能回復がもたらされている可能性がある.

これまでの研究から低出力衝撃波は血管内皮細胞に働くことによりVEGFを誘導している事が解明されている. 脊髄には灰白質に豊富に血管が存在することから、現在進行中である組織学的な検討により更なる機序の解明を行いたい.



## E. 結論

脊髄損傷後の低出力体外衝撃波照射により、VEGF, BDNF とそれぞれの受容体の mRNA が 7 日目までの急性期に増加していた。VEGF, BDNF の早期の回復が下肢運動機能の改善につながると考えられた。

## G. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表

- ① 山屋誠司, 小澤浩司ほか: 脊髄損傷に対する低出力体外衝撃波の効果  
第26回日本整形外科学会基礎学術集会  
(2011年10月20-21日, 群馬県前橋市)
- ② Yamaya S, Ozawa H, et al. Effect of Low-Energy Extracorporeal Shock Wave Therapy on Spinal Cord Injury.  
Orthopaedic Research Society 2012 (2012年2月4-7日, San Francisco, U.S.A).

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 糸球体腎炎に対する体外衝撃波治療

研究分担者 伊藤 貞嘉 東北大学大学院医学系研究科腎高血圧内分泌学・教授  
研究分担者 清元 秀泰 東北大学東北メディカルメガバンク機構地域医療支援部門・教授  
研究分担者 森 建文 東北大学大学院医学系研究科腎高血圧内分泌学・准教授

### 研究要旨

メサンギウム増殖性糸球体腎炎では、免疫機序に基づく腎糸球体メサンギウム細胞の増殖のみならず浸潤するマクロファージが増悪因子として働いている。浸潤したマクロファージは細胞増殖性サイトカインの放出を介して、メサンギウム細胞の増殖、細胞外基質の拡大に関与する。本研究では浸潤するマクロファージに対して、低侵襲性体外衝撃波治療を応用し、アポトーシスに誘導できないかを検討した。結論として、腎炎の極期で評価した場合、衝撃波を連日加えても炎症細胞浸潤（ED-1陽性細胞数）を抑制することはできなかった。このことより、メサンギウム増殖性糸球体腎炎モデルのThy1腎炎では衝撃波の有効性を確認することはできなかった。

### A. 研究目的

メサンギウム増殖性糸球体腎炎では、免疫機序に基づく腎糸球体メサンギウム細胞の増殖のみならず浸潤するマクロファージが増悪因子として働いている。浸潤したマクロファージは組織障害を引き起こすだけでなく細胞増殖性サイトカインの放出を介して、メサンギウム細胞の増殖、細胞外基質の拡大に関与する。そこで、浸潤するマクロファージに対して、低侵襲性体外衝撃波でアポトーシスに誘導できれば糸球体腎炎に対する有効な治療法が十分でない腎領域に新たな方向性を持たせることができると考え、以下の研究を行った。

### B. 研究方法

糸球体腎炎はThy1.1抗体（ER4G）を用いて、SDラットにおいて作成した。簡単に、8週齢のSDラットの静脈内にER4G（1mg/kg）を投与することで作成した。腎炎ネズミは代謝ケージに入れて管理し、タンパク尿を経時的に測定する。衝撃波治療群では、側腹部より左腎に低出力の衝撃波を連日照射し、腎炎誘発7日目に十分な麻酔をかけた状態で正中切開し、大動脈を灌流し腎を摘出し組織障害を観察し衝撃波治療の効果を評価する。

### C. 研究結果

図1に示すように、Thy1腎炎を誘発すると3日目には顕性タンパク尿を認め、1週間持続した。低侵襲性体外衝撃波治療法を片腎に加えてもタンパク尿抑制効果は認めなかった。

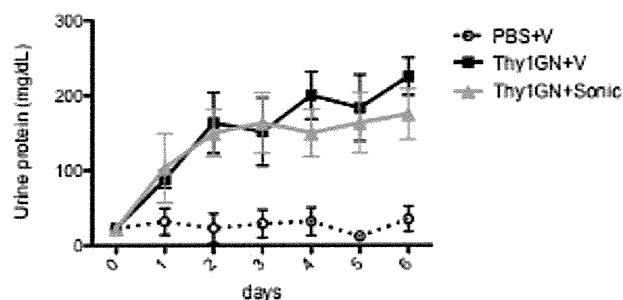


図1

7日目の腎炎組織をHE染色、MT染色およびPAS染色で染色し病理学的スコアを用いて評価した（図2）

。作成した糸球体腎炎に対して、1週間の低侵襲性体外衝撃波治療法を加えても、特に糸球体細胞数、糸球体動脈瘤抑制効果、病理学スコアの改善も認めなかった。更に免疫組織学的なマクロファージの浸潤をED-1陽性細胞数のカウントで評価したが、特に炎症細胞浸潤の抑制効果も認められなかった（図3）。

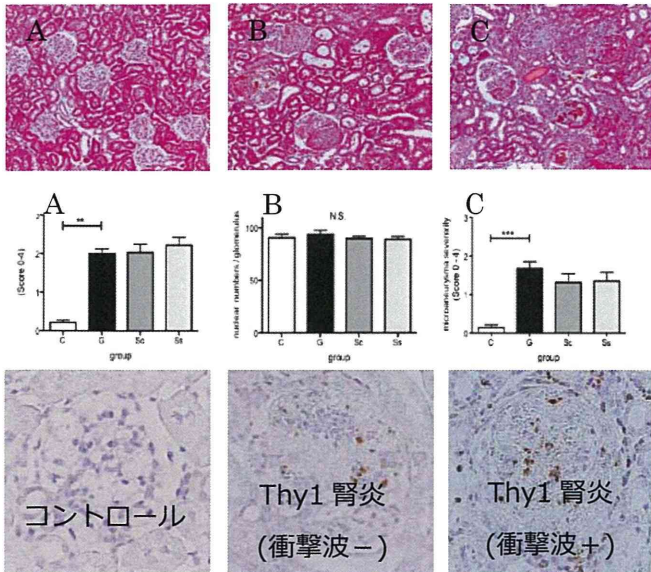


図 2

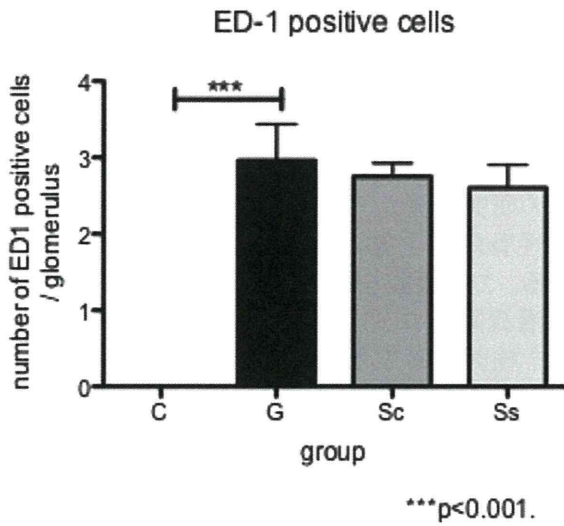


図 3

#### D. 考察

このモデルでは腎炎の発症・進展機序に炎症細胞浸潤や血管新生などの依存が少ない可能性がある。腎疾患への応用を考慮するには、更に、モデルを変更した検討が必要であると考えられる。

#### E. 結論

以上の結果より、実験的糸球体腎炎 (Thy1 腎炎) では低侵襲性体外衝撃波治療法の有用性を確認することができなかった。

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 急性腎障害に対する体外衝撃波治療

研究分担者 伊藤貞嘉 東北大学大学院医学系研究科腎高血圧内分泌学・教授  
研究分担者 森 建文 東北大学大学院医学系研究科腎高血圧内分泌学・准教授

### 研究要旨

急性腎障害は感染や造影剤、抗がん剤を代表としたの薬剤等でみられる急性の腎障害で腎虚血が重要なメカニズムを担っている。我々は低出力体外衝撃波 (Extracorporeal shock wave, ESW) が腎虚血による急性腎障害に対して有効であるという仮説を立て、以下の実験を行った。8週齢雄Sprague-Dawleyラットに腎虚血再灌流モデルを作成し、術直後および24・48時間後に、両腎に0.25 mJ/mm<sup>2</sup>、4.0 HzのESWを400 shocks/day与えるESW群と与えないコントロール (CON) 群の2群 (各n=8) に分けた。術48時間後に腎、血漿を採取し、腎重量、血漿Cr値および組織所見を評価した。ESW群ではCON群と比較して、有意な左腎重量の増加抑制 (0.45±0.01 vs 0.52±0.02 g/100g体重)、血漿Cr値の低下 (0.32±0.02 vs 0.43±0.03 mg/dL) を認め、腎髄質外層の障害は改善傾向にあった。以上の結果からESWが虚血による急性腎障害に対し有効である可能性が推察された。今後定量的な組織改善効果を検証していく予定である。

### A. 研究目的

急性腎障害は感染や造影剤、抗がん剤といった薬剤によりみられる急性に進行する一過性の腎障害であるが、致死率も高い。虚血による急性尿細管壊死が急性腎障害の主原因であると考えられているが、回復し正常化するものと腎死に至るもののメカニズムの差に関しては十分に明らかになっていない。

急性腎障害の主な障害部位は腎髄質外層であると言われている。腎髄質は皮質に比べ血流が1割未満であるが、多くの尿細管の栄養血流である。対向流増幅系により動脈から静脈に酸素が奪われるため、髄質は常に低酸素下にある。腎髄質外層の尿細管は酸素を消費するNa再吸収を行っているため、わずかな血流の減少でも、この部位は虚血に陥りやすい。特に高血圧や糖尿病などの生活習慣病では腎髄質血流の低下があるとともこの部位尿細管で酸素消費が亢進し、虚血に陥りやすいことが知られている。

今まで我々は腎髄質外層の尿細管が一酸化窒素や活性酸素を産生することにより、髄質血流を調節し、高血圧や慢性腎臓病の病態に関与していることを報告している。

Vascular endothelial growth factor (VEGF) もまた髄質循環に関わることが報告されている。VEGFは近位尿細管より産生され、虚血再灌流障害を抑制することが報告されている。

研究代表者の下川らは低出力体外衝撃波治療法を開発し、ブタの虚血性心筋障害でVEGFの発現

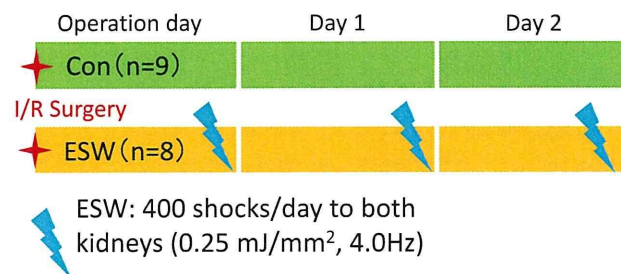
増加を伴った左室機能の改善効果を報告している。

以上の研究背景から、我々は低出力体外衝撃波が虚血性腎障害を抑制するのではないかと仮説を立てる。この仮説を検証するためにラットの腎虚血再灌流障害に対する低出力体外衝撃波治療の効果を検討することを目的とする。

### B. 研究方法

8週齢雄Sprague-Dawleyラットの左腎動静脈を45分間、血管クリップでクランプし、腎虚血再灌流モデルを作成する。図1のように術直後および24・48時間後に、両腎に0.25 mJ/mm<sup>2</sup>、4.0 Hzの低出力体外衝撃波 (Extracorporeal shock wave, ESW) を400 shocks/day与えるESW群と与えないコントロール (CON) 群の2群 (各n=8) に分ける。術48時間後に腎、血漿を採取し、腎重量、血漿Cr値および組織所見 (PAS染色) を評価する。

図1：研究プロトコール





(倫理面への配慮)

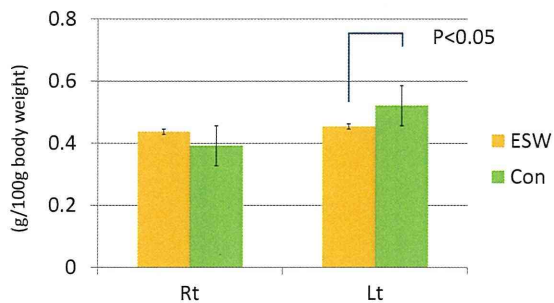
本研究は、ガイドラインに従い、実験動物に対する十分な動物愛護上の配慮の下、東北大学動物実験専門委員会の承認を得た上で実験を行っている。

### C. 研究結果

#### 1. 低出力体外衝撃波の腎重量に対する影響

虚血再灌流をかけた左腎では腎重量が増加し、これはESWにより有意に抑制された(図2)。

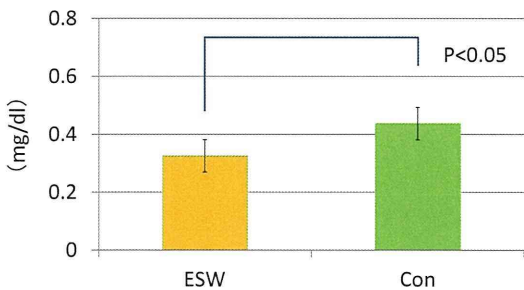
図2：腎虚血再灌流および低出力体外衝撃波後の腎重量



#### 2. 低出力体外衝撃波の血漿クレアチニン値に対する影響

ESWをかけたラットの血漿クレアチニン値はかけていないラットに比べ有意に減少していた(図4)。

図4：低出力体外衝撃波後の血漿クレアチニン値



#### 3. 組織学的検討

虚血再灌流を受けた腎臓では腎髄質外層を中心としたcast(図5)、壊死(図6)、脱落(図7)がみられた。

図5：腎虚血再灌流による尿細管cast

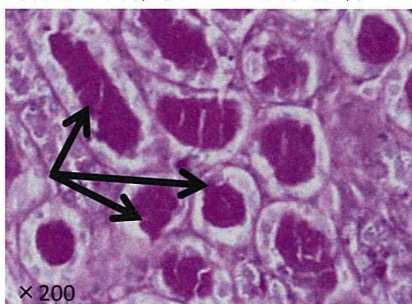


図6：腎虚血再灌流による壊死

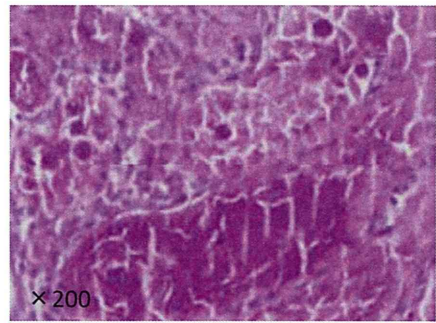
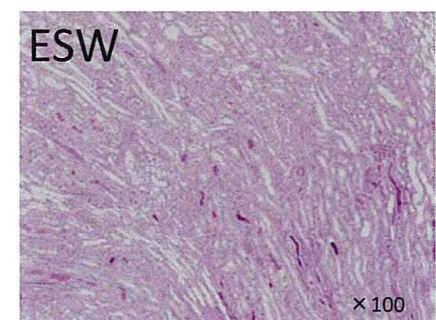
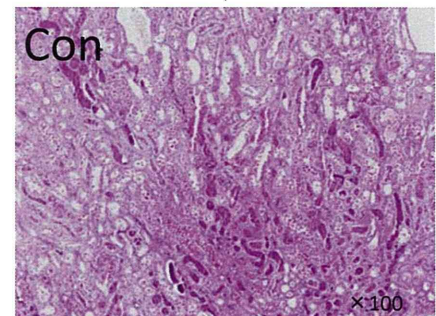


図7：虚血再灌流による脱落



ESW群の髄質外層はCon群に比べ尿細管障害が弱い傾向にあった(図8)。

図8：低出力体外衝撃波の組織に対する影響



### D. 考察

低出力体外衝撃波治療により、腎障害が改善する可能性が示された。腎重量と血漿クレアチニン値からは低出力体外衝撃波が腎保護に働く可能性が示されたが、組織障害改善部位がびま

ん性ではなく、定量的評価に苦渋している。びまん性に体外衝撃波をあてる工夫が必要と考えられた。また、未だVEGFの発現に関しては検討しておらず今後の課題である。

#### E. 結論

低出力体外衝撃波治療は、虚血再灌流による急性腎障害に対し、保護的に働く可能性が示唆され、腎疾患の新たな治療法として期待される。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- ③ 齊藤舞、中道崇、森建文、伊藤貞嘉、伊藤健太、下川宏明：ラット腎虚血再灌流モデルに対する体外衝撃波の効果。第55回日本腎臓学会学術総会（2012年6月1-3日、横浜）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 肝硬変に対する体外衝撃波治療

研究分担者 川岸 直樹 東北大学病院臓器移植医療部・准教授  
研究分担者 赤松 順寛 東北大学病院救命センター・助教  
研究分担者 中野 徹 東北大学病院乳腺内分泌外科・助教

### 研究要旨

ひとたび肝硬変になった肝臓を元の状態に戻す方法は今のところ見出されていない。従来の治療法は残された肝臓の機能を助け、合併症をコントロールすることが大切とされており、本質的に有効な治療法は今のところない。したがって低侵襲で、かつ有効性の高い新しい治療法の開発が強く望まれている。低出力衝撃波を体外から虚血組織に照射することによって血管新生作用や心筋リモデリング抑制作用がすでに報告されている。本研究では、肝臓に対する低出力衝撃波の及ぼす作用を明らかにすることと、肝硬変に対して、肝細胞再生を促し、繊維化を改善することができないかを動物モデルを用いて検討することを目的とする。

### A. 研究目的

肝硬変の原因はウイルス性、アルコール性、非アルコール性、自己免疫性など様々であるが慢性炎症を背景にして組織の破壊、再生を繰り返すうちに肝の繊維化が進む疾患である。従来の治療法は薬物療法や生活習慣改善などが主であるが、いずれも肝硬変の進行を緩めようとするものや合併症をコントロールする治療が主であった。原因が除去されても硬変肝の線維化を改善させるような、あるいは肝細胞再生を優位にさせるような本質的な治療法はいまだ登場していない。

体外衝撃波治療は、尿路結石破碎治療として、20年以上前から保険適応となっている安全で副作用のない確立した治療法である。東北大学循環器内科の下川（研究代表者）らは、低出力（尿路結石破碎治療に用いる出力の10%）の衝撃波を用いた非侵襲性血管新生療法を開発し、虚血性心疾患において、その有効性と安全性を基礎的・臨床的研究により確認し論文発表している。また、東北大学先進外科の佐藤（研究分担者）とともに下肢虚血を対象に論文を発表し、現在、臨床試験を行っている。肝硬変の形成過程では肝細胞の破壊と再生が継続的に生じており、再生より破壊が優位となり肝の線維化が進行する。衝撃波により種々の増殖因子やサイトカインが動員されることが報告されており、肝再生にもVEGFなどの血管新生因子やHGFなどの増殖因子が協調して作用することが知られている。本研究では、肝臓に対する低出力衝撃波の及ぼす作用を明らかにすることと、肝硬変に対して、肝細胞再生を促し、繊維化を改善することができないかを動物モデルを用いて検討することを目的とする。

### B. 研究方法

麻酔下にSDラット（8～9週齢）健康肝に、季肋部より体外衝撃波（0.55mJ/mm<sup>2</sup>, 3Hz, 1000shocks）を照射し、第7病日に犠牲死させ組織学的検討および血液生化学的検討をおこなう。SDラット（8～9週齢）に対し70%肝部分切除を施行する。施行後、残肝に衝撃波を直接照射し、72時間後に犠牲死させる。摘出した肝を用いて免疫組織学的に検討をするとともに血管新生因子について分子生物学的に検討する。摘出肝重量/予想残肝重量比を求め衝撃波を照射していない対象群と比較検討する。SDラットに四塩化炭素を週2回・12週間腹腔内投与することによりラット薬剤性肝硬変モデルを作製する。四塩化炭素を投与することにより新犬山分類F3, F4を同程度作成できることが知られている。作成した肝硬変ラットに対して体外衝撃波を照射する。線維化の程度を組織学的に比較検討する。具体的には繊維化面積の全体に占める割合を測定する。procollagen、TGF- $\beta$ 、MMPの定量PCRを行い抗線維化作用を解析する。門脈周囲の小葉構造と新生血管を免疫組織学的に解析する。摘出肝を用いてVEGF、HGFをといった血管新生因子、増殖因子の発現について免疫組織学的、分子生物学的に検討する。

（倫理面への配慮）

四塩化炭素投与はin vivoにおける線維肝モデルとして必要であり、他にかわる方法はない（ジメチルニトロサミン投与でも繊維肝の作成は可能であるが、同様に肝毒投与であり人道的観点からの優劣はつけられない）。本研究は東北大学動物実験専門委員会の承認を得た上でやっている。

### C. 研究結果

衝撃波を体外照射したラット健康肝の組織学

的に門脈周囲に微小出血が見られたが、他肝臓組織及び構造に著明な変化を認めなかった。70%肝切除後残肝への照射実験において摘出肝重量/予想残肝重量比は治療群が $6.75 \pm 1.90$ 、control群 $6.52 \pm 1.89$  ( $p=0.38$ ) と有意差は得られなかった。現在、肝での血管新生、組織増殖因子であるVEGF、HGFの発現について免疫組織学的検討およびRNAレベルでの検討を進めている。

SDラットに四塩化炭素を腹腔内投与した実験では衝撃波照射可能なラットは全体の70%となる。肝硬変の程度にはばらつきがあり新犬山分類でF3、F4が同程度であった。薬剤性肝硬変モデルの作成に3か月を要するため、現在実験に必要なモデルラットの作成および頭数の確保を進め、照射実験の準備及び検討事項の解析のための準備を行っている。

#### D. 考察

低出力体外衝撃波が肝臓に及ぼす作用については未知であるため、今回の実験では肝硬変への治療的照射の前段階として、健康肝および肝切除後肝に照射した。残肝重量比では対照群との差は認められなかったが、正常肝と慢性炎症状態の肝では衝撃波の影響に違いがある可能性が示唆された。薬剤性肝硬変モデルラットを用いた実験により衝撃波に対する影響を線維化の程度および血管新生因子の発現について検討することが求められたため、今後実験を進めていく必要がある。衝撃波照射肝の門脈周囲に微小出血を認め、門脈血管新生の初期像である可能性はあるが今後の検討が望まれた。肝細胞、および小葉構造に変化を認めず、低出力体外衝撃波は安全に行うことができると考えられた。

#### E. 結論

肝硬変に対する低出力体外衝撃波治療の有効性について、今後研究を進めていくことが必要である。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ito K, Fukumoto Y, Shimokawa H.	Extracorporeal shock wave therapy for ischemic cardiovascular disorders.	Am J Cardiovasc Drugs.	11	295-302	2011
Serizawa F, Ito K, Matsubara M, Sato A, Shimokawa H, Satomi S.	Extracorporeal shock wave therapy induces therapeutic lymphangiogenesis in a rat model of secondary lymphoedema.	Eur J Vasc Endovasc Surg.	42	254-260	2011
Serizawa F, Ito K, Kawamura K, Tsuchida K, Hamada Y, Zukeran T, Shimizu T, Akamatsu D, Hashimoto M, Goto H, Watanabe T, Sato A, Shimokawa H, Satomi S.	Extracorporeal shock wave therapy improves the walking ability of patients with peripheral artery disease and intermittent claudication.	Circ J.	in press	in press	2012

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

# Extracorporeal Shock Wave Therapy for Ischemic Cardiovascular Disorders

Kenta Ito, Yoshihiro Fukumoto and Hiroaki Shimokawa

Department of Cardiovascular Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan

## Contents

Abstract	295
1. Introduction	296
2. <i>In vitro</i> Study	296
3. Extracorporeal Cardiac Shock Wave (SW) Therapy for Angina Pectoris	296
3.1 Animal Studies	296
3.2 Clinical Studies	297
4. Extracorporeal Cardiac SW Therapy for Acute Myocardial Infarction	298
5. SW Therapy for Other Ischemic Disorders	300
6. Advantages of Extracorporeal Cardiac SW Therapy	300
7. Conclusions	300

## Abstract

Ischemic heart disease is the leading cause of death and a major cause of hospital admissions, with the number of affected patients increasing worldwide. The current management of ischemic heart disease has three major therapeutic options: medication, percutaneous coronary intervention (PCI), and coronary artery bypass grafting (CABG). However, the prognosis for patients with severe ischemic heart disease without indications for PCI or CABG still remains poor due to the lack of effective treatments. It is therefore crucial to develop alternative therapeutic strategies for severe ischemic heart disease. Extracorporeal shock wave (SW) therapy was introduced clinically more than 20 years ago to fragment kidney stones, which has markedly improved the treatment of urolithiasis. We found that a low-energy SW (about 10% of the energy density used for urolithiasis) effectively increases the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cultured endothelial cells. Based on this *in vitro* study, we initiated *in vivo* studies and have demonstrated that extracorporeal cardiac SW therapy with a low-energy SW up-regulates the expression of VEGF, induces neovascularization, and improves myocardial ischemia in a porcine model of chronic myocardial ischemia, without any adverse effects *in vivo*. On the basis of promising results in animal studies, we performed a series of clinical studies in patients with severe coronary artery disease without indication for PCI or CABG, including, firstly, an open trial followed by a placebo-controlled, double-blind study. In both studies, our extracorporeal cardiac SW therapy improved symptoms, exercise capacity, and myocardial perfusion in patients with severe coronary artery disease. Importantly, no procedural complications or adverse effects were noted. The SW therapy was also effective in ameliorating left ventricular remodeling after acute myocardial infarction (MI) in pigs and in enhancing angiogenesis in hind-limb ischemia in rabbits. Based on these animal studies, we are also conducting clinical studies in patients with acute MI and in those with peripheral artery disease. Thus, our extracorporeal cardiac SW therapy appears to be an effective, safe, and non-invasive angiogenic approach in cardiovascular medicine and its indication could be extended to a variety of ischemic diseases in the near future. In this article, we briefly summarize our work in animals and humans, and discuss the advantages and perspectives of our extracorporeal SW therapy.



## 1. Introduction

Ischemic heart disease is the leading cause of death and a major cause of hospital admissions, with the number of affected patients increasing worldwide.<sup>[1]</sup> The current management of ischemic heart disease has three major therapeutic options: medication, percutaneous coronary intervention (PCI), and coronary artery bypass grafting (CABG). However, the prognosis for patients with severe ischemic heart disease without indications for PCI or CABG still remains poor due to the lack of effective treatments. Therefore, it is crucial to develop alternative therapeutic strategies for severe ischemic heart disease. During this decade, a variety of regenerative therapies, such as gene and cell therapies, have been investigated.<sup>[2-12]</sup> However, most of these regenerative therapies are invasive in nature. In addition, although many of these therapies have been shown to be effective in animal models, their efficacy and safety have not yet been fully established in clinical trials.<sup>[13-20]</sup>

Extracorporeal shock wave (SW) therapy was introduced clinically more than 20 years ago to fragment kidney stones, and has markedly improved the treatment of urolithiasis. Extracorporeal SW lithotripsy with high-energy SW is also indicated for gallstones and pancreatic and salivary stones. We have previously reported that low-energy cardiac SW therapy effectively induces neovascularization and improves myocardial ischemia in a porcine model of chronic myocardial ischemia.<sup>[21,22]</sup> Based on the promising results from animal studies, we first reported that low-energy cardiac SW therapy significantly improved symptoms and myocardial perfusion and reduced the use of nitroglycerin.<sup>[23]</sup> In this article, we briefly summarize our work in animals and humans, and discuss the advantages and perspectives of our low-energy SW therapy for ischemic diseases.

## 2. *In vitro* Study

SW is a longitudinal acoustic wave that propagates through water or soft tissue as ultrasound does. In contrast to ultrasound, SW is a single pressure pulse with a short needle-like positive spike <1  $\mu$ sec in duration and up to 100 MPa in amplitude, followed by a tensile wave of several  $\mu$ sec with lower amplitude. We and others demonstrated that low-energy SW enhances nitric oxide (NO) production<sup>[24]</sup> and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor, fms-related tyrosine kinase 1 (Flt-1), in cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) *in vitro* (figure 1).<sup>[21]</sup>

Importantly, we demonstrated that the expression of VEGF peaked at 0.09 mJ/mm<sup>2</sup> in cultured endothelial cells, at ap-

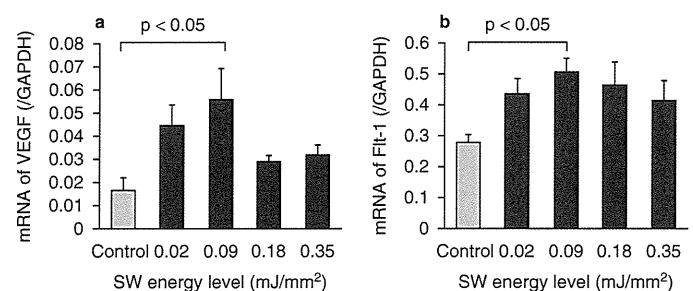
proximately 10% of the energy used for lithotripsy treatment in the clinical setting (figure 1).<sup>[21]</sup> Subsequently, Yip et al.<sup>[25]</sup> reported that low-energy SW applied to bone-marrow-derived mononuclear cells (BMDMNCs) enhanced VEGF production from BMDMNCs and their differentiation into endothelial phenotype cells.<sup>[25]</sup> In addition, Nurzynska et al.<sup>[26]</sup> reported that low-energy SW activated proliferation and differentiation in cardiac primitive cells. Tamma et al.<sup>[27]</sup> also reported that SW induced the proliferation and differentiation of osteoblasts and reduced their secretion of pro-osteoclastogenic factors.

SW exerts a 'cavitation effect' (a  $\mu$ m-sized violent collapse of bubbles inside and outside the cells)<sup>[28]</sup> and was shown to induce localized stress on cell membranes that resembles shear stress,<sup>[29]</sup> due to the localized nature of the physical forces generated by cavitation.<sup>[30]</sup> Several biochemical effects of SW have been reported including hyperpolarization, Ras activation, non-enzymatic NO synthesis, and induction of stress fibers and intercellular gaps.<sup>[31-33]</sup> However, detailed intracellular mechanisms of SW action remain to be elucidated.

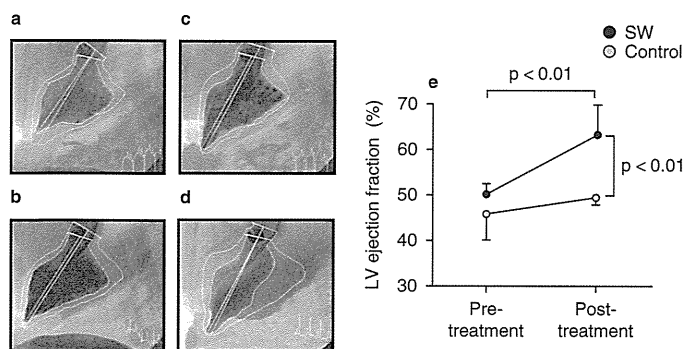
## 3. Extracorporeal Cardiac Shock Wave (SW) Therapy for Angina Pectoris

### 3.1 Animal Studies

Based on our *in vitro* study, we examined whether low-energy SW could ameliorate myocardial ischemia in a porcine model *in vivo*. A porcine model of chronic myocardial ischemia was made by placing an ameroid constrictor at the proximal segment of the left circumflex (LCX) coronary artery. This gradually induced a total occlusion of the artery with sustained myocardial dysfunction but without myocardial infarction in 4 weeks.<sup>[21]</sup> At 4 weeks after the implantation of the ameroid



**Fig. 1.** Effects of shock wave (SW) therapy on mRNA expression in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) *in vitro*. SW treatment up-regulated mRNA expression as a proportion of glyceraldehyde dehydrogenase (GAPDH) mRNA expression of (a) vascular endothelial growth factor (VEGF) and (b) VEGF receptor, Flt-1, with a maximum effect noted at 0.09 mJ/mm<sup>2</sup>, a level that is approximately 10% of that used for urinary lithotripsy. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 10 in each group). From Nishida et al.,<sup>[21]</sup> with permission.



**Fig. 2.** Effects of shock wave (SW) therapy on left ventricular (LV) function in pigs *in vivo*. The extracorporeal cardiac SW therapy improved ischemia-induced myocardial dysfunction *in vivo* as evaluated by left ventriculography. Four weeks after the implantation of an ameroid constrictor, LV wall motion of the LCX (posterolateral) region was reduced in both (a) the control and (c) the SW group (before SW therapy). Eight weeks after the implantation of an ameroid constrictor, no significant change in LV wall motion was noted in the control group (b), whereas marked recovery was noted in the SW group (d). (e) SW therapy normalized LV ejection fraction in the SW group but not in the control group. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n=8$  in each group). From Nishida et al.,<sup>[21]</sup> with permission.

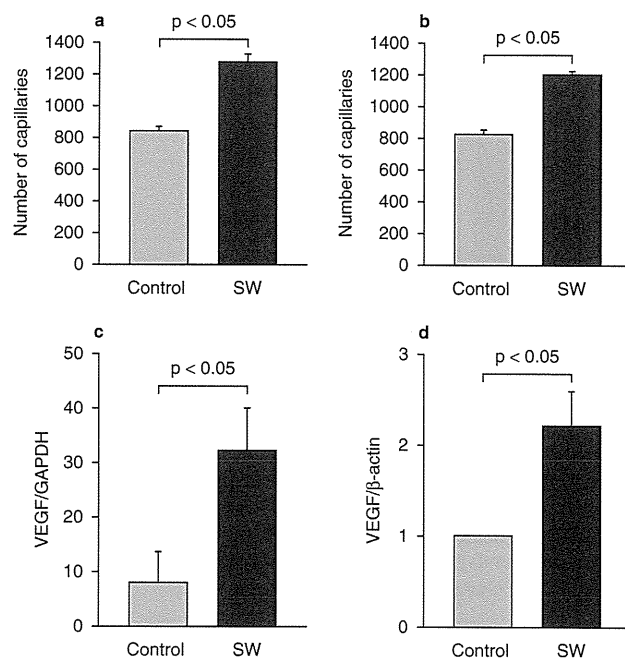
such as tissue injury, hemorrhage, or arrhythmia, were noted during or after the SW therapy. These results suggest that the low-energy cardiac SW therapy activates the endogenous angiogenic system in pigs *in vivo*.<sup>[21]</sup> This was the first report to demonstrate the potential usefulness of extracorporeal cardiac SW therapy as a non-invasive treatment for chronic myocardial ischemia.

### 3.2 Clinical Studies

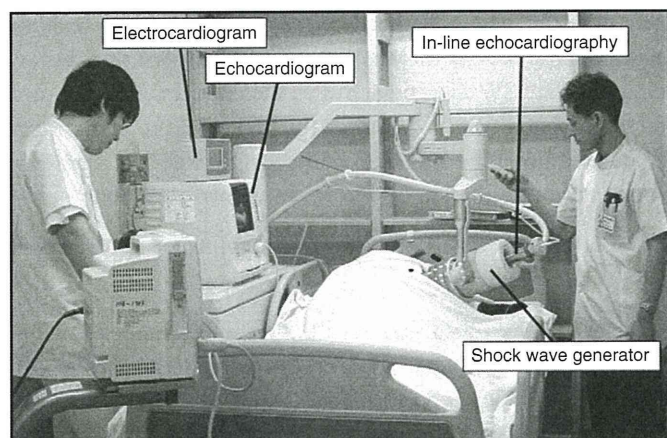
Based on the promising results in animal studies, we performed the first clinical trial of extracorporeal cardiac SW therapy in an open-labeled manner.<sup>[23]</sup> We performed cardiac SW therapy (200 shots/spot at 0.09 mJ/mm<sup>2</sup> for 20–40 spots, three times a week/series) in nine patients with end-stage coronary artery disease (CAD) with no indication for PCI or CABG (55–82 years old, five men and four women). During the therapy, the patients lay on the bed in a supine position without any anesthesia (figure 4). Importantly, our SW therapy significantly improved symptoms and reduced nitroglycerin use

constrictor, we performed extracorporeal SW therapy to the ischemic myocardium three times during the first week ( $n=8$ ), whereas animals in the control group ( $n=8$ ) received the same anesthesia procedures three times a week but without the SW treatment. Based on our *in vitro* experiments, we applied low-energy SW (0.09 mJ/mm<sup>2</sup>) to nine spots in the ischemic LCX region (200 shots/spot) with the guidance of an echocardiogram equipped with a specially designed SW generator (Storz Medical AG, Tägerwil, Switzerland). In order to treat the targeted ischemic myocardium without inducing ventricular arrhythmia, we applied SW at end-diastole during the cardiac cycle with an R-wave-triggered system. We evaluated cardiac function before (baseline) and at 4 and 8 weeks after the ameroid implantation.

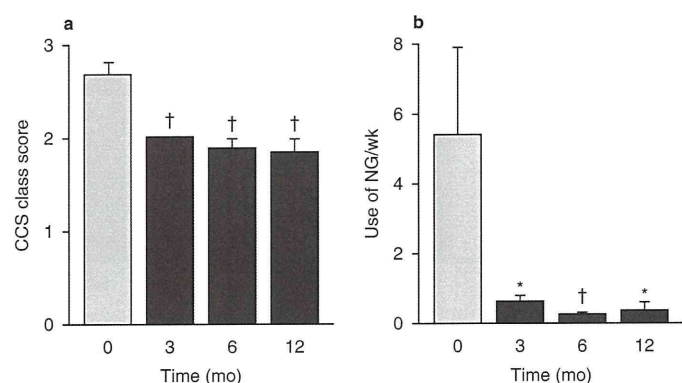
Four weeks after the implantation of an ameroid constrictor, wall motion of the posterolateral (LCX) region in the left ventricle (LV) was reduced in both the control and the SW groups to the same extent (figure 2a,c). However, 4 weeks after the SW therapy, left ventriculography showed marked improvement of LV wall motion only in the SW group (figure 2b,d). The SW therapy normalized the LV ejection fraction in the SW group but not in the control group (figure 2e). In this study, the SW treatment normalized global and regional myocardial function as well as regional myocardial blood flow in the chronic ischemic region, evaluated using colored microspheres (Dye-Trak, Triton Technology) and spectrophotometry. In addition, the SW therapy increased capillary density and up-regulated VEGF expression in the ischemic myocardium *in vivo* (figure 3). Importantly, no procedural complications or adverse effects,



**Fig. 3.** Effects of shock wave (SW) therapy on capillary density and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the ischemic myocardium in pigs *in vivo*. The extracorporeal cardiac SW therapy increased the density of factor VIII-positive capillaries and VEGF expression in the ischemic myocardium. Capillary density was significantly greater in the SW group than in the control group in both (a) the endocardium and (b) the epicardium. The (c) mRNA expression and (d) protein levels of VEGF as proportions of glyceraldehyde dehydrogenase (GAPDH) mRNA expression and  $\beta$ -actin, respectively, were significantly higher in the SW group than in the control group. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n=6$  in each group). From Nishida et al.,<sup>[21]</sup> with permission.



**Fig. 4.** Extracorporeal cardiac shock wave (SW) therapy in action in a patient with severe coronary artery disease. The machine is equipped with a SW generator and in-line echocardiography. The SW generator is attached to the chest wall of the patient when used. The SW pulse is easily focused on the ischemic myocardium under the guidance of echocardiography. There is no need for anesthesia or sedatives.



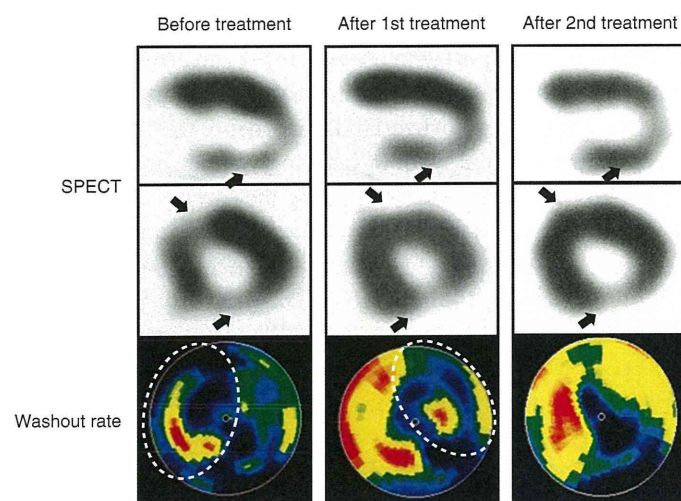
**Fig. 5.** Effects of extracorporeal cardiac shock wave (SW) therapy on symptoms and the use of nitroglycerin. Extracorporeal cardiac SW therapy significantly improved (a) the Canadian Cardiovascular Society (CCS) class scores and (b) number of nitroglycerin (NG) uses per week in patients with severe angina pectoris. Results are expressed as mean ± SEM. \*  $p < 0.05$ , †  $p < 0.01$  vs 0 month (statistically analyzed by a *post hoc* test after one-way ANOVA). From Fukumoto et al.,<sup>[23]</sup> with permission.

(figure 5) and improved myocardial perfusion as assessed by dipyridamole stress thallium scintigraphy only in the ischemic area treated with the SW therapy (figure 6). These beneficial effects of the SW therapy persisted for at least 12 months. No procedural complications or adverse effects were noted. These results indicated that our extracorporeal cardiac SW therapy was a safe, effective, and non-invasive therapeutic strategy for severe ischemic heart disease.<sup>[23]</sup> Following our initial report, several clinical studies with positive results were reported worldwide.<sup>[34-37]</sup> To confirm the usefulness and safety of our

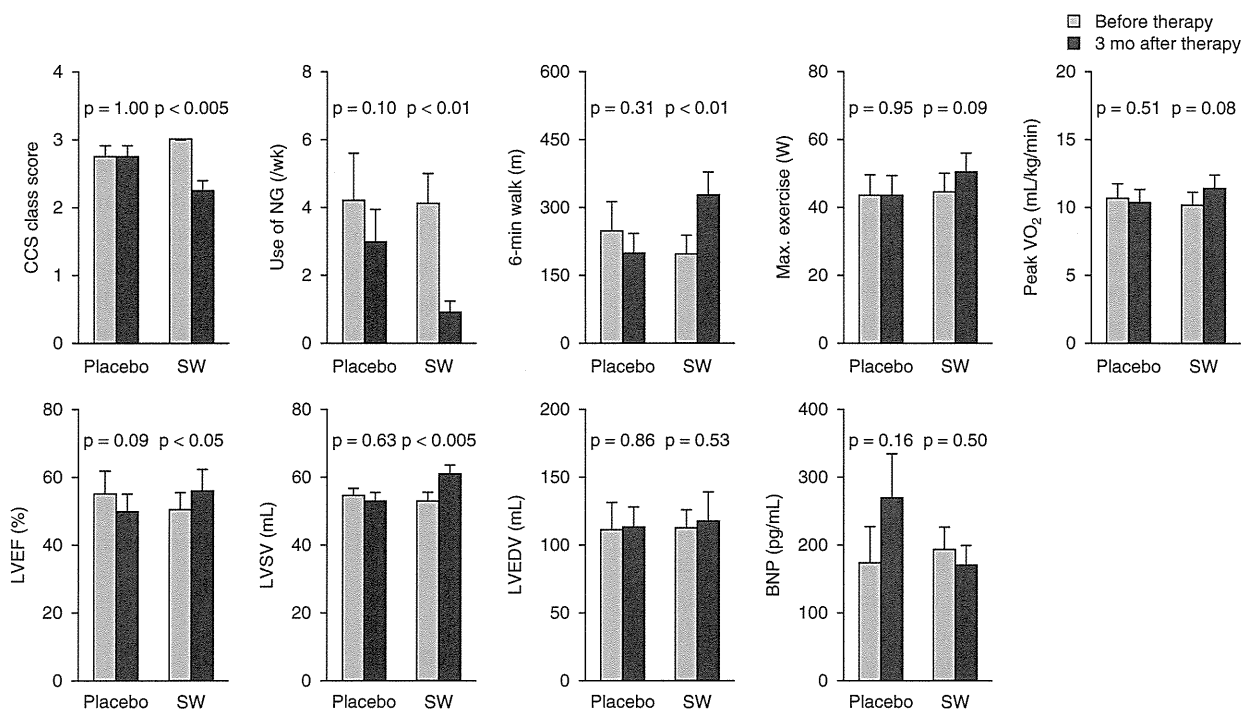
SW therapy, we performed a second clinical trial in a randomized and placebo-controlled manner. In this second trial, again we were able to demonstrate that the low-energy SW therapy not only improved symptoms and reduced nitroglycerin use, but also improved LV function (figure 7), establishing cardiac SW therapy as an effective and safe angiogenic strategy for severe ischemic heart disease.<sup>[38]</sup> As described above, extracorporeal cardiac SW therapy improved the quality of life in patients with angina pectoris. However, it is still not known whether our SW therapy improves the long-term prognosis of those patients. Further studies are needed.

#### 4. Extracorporeal Cardiac SW Therapy for Acute Myocardial Infarction

The development of emergent reperfusion therapy has dramatically reduced the mortality of patients with acute myocardial infarction (AMI). However, LV remodeling following AMI, which leads to heart failure, sudden cardiac death, and poor prognosis,<sup>[39]</sup> still needs to be addressed. It was reported that capillary density in the border zone is negatively correlated with infarct size 1 month after AMI, suggesting the importance of adequate growth of the capillary microvasculature.<sup>[40]</sup> It is highly expected that enhancing neovascularization in the



**Fig. 6.** Effects of extracorporeal cardiac shock wave (SW) therapy on myocardial perfusion in patients with severe angina pectoris. Dipyridamole stress thallium-201 single photon emission computed tomography (SPECT) imaging and polar map in a patient with severe three-vessel coronary artery disease before and after SW therapy. The results clearly demonstrated that SW therapy ameliorated myocardial perfusion only where SW was applied; in the anteroseptal wall after the first treatment and in the lateral wall after the second treatment (arrows) in a step-wise manner after the staged SW treatment. The areas treated with SW therapy are indicated with dotted lines. From Fukumoto et al.,<sup>[23]</sup> with permission.

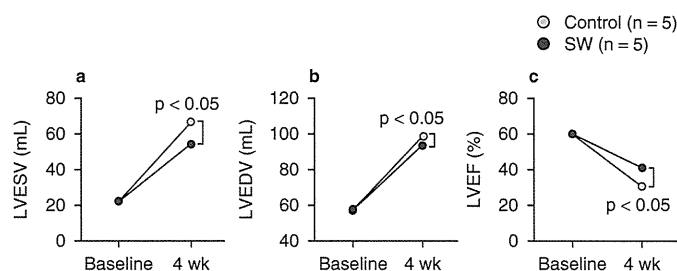


**Fig. 7.** Effects of extracorporeal cardiac shock wave (SW) therapy in patients with severe angina pectoris in the placebo-controlled and double-blind study. **BNP**=brain natriuretic peptide; **CCS**=Canadian Cardiovascular Society; **LVEDV**=left ventricular (LV) end-diastolic volume; **LVEF**=LV ejection fraction; **LVSV**=LV stroke volume; **max. exercise**=maximum exercise capacity in watts (W); **NG**=nitroglycerin; **peak VO<sub>2</sub>**=peak oxygen uptake. Results are mean±SE (n=8 in each group). From Kikuchi et al.,<sup>[38]</sup> with permission.

border zone adjacent to the infarcted myocardium could ameliorate the progression of LV remodeling in patients with AMI. Thus, we examined whether SW therapy is also effective in ameliorating LV remodeling after AMI in pigs *in vivo*. AMI was created by surgically excising the proximal segment of the LCX.<sup>[41]</sup> Low-energy SW therapy (200 shots/spot at 0.09 mJ/mm<sup>2</sup>, three times a week) was started 3 days after AMI. The remaining animals were treated in the same manner but without the SW treatment as a control group. Four weeks after the treatment, LV ejection fraction, LV end-systolic volume, and LV end-diastolic volume were significantly improved in the SW group compared with the control group (figure 8). Furthermore, regional myocardial blood flow and number of capillaries in the border zone were significantly improved in the SW group compared with the control group. Again, no procedural complications or adverse effects were noted. These results suggest that our extracorporeal cardiac SW therapy is an effective and non-invasive therapy for ameliorating LV remodeling after AMI. This is the first report to demonstrate the usefulness and safety of extracorporeal cardiac SW therapy as a non-invasive treatment of AMI. We were also able to confirm the beneficial effects and safety of cardiac SW therapy in another porcine

model of myocardial ischemia/reperfusion (90-minute ischemia) to mimic the clinical setting.<sup>[42]</sup>

We are currently conducting the first clinical trial in AMI patients who have been successfully treated with PCI, in order to examine whether our cardiac SW therapy combined with PCI ameliorates LV remodeling and dysfunction after AMI in humans.



**Fig. 8.** Effects of extracorporeal cardiac shock wave (SW) therapy on left ventricular (LV) remodeling in pigs *in vivo*. SW therapy significantly ameliorated LV remodeling characterized by the increase in (a) LV end-systolic volume (LVESV) and (b) end-diastolic volume (LVEDV) and (c) reduced LV ejection fraction (LVEF) in a porcine model of AMI. From Uwatoku et al.,<sup>[41]</sup> with permission.