

—特集「再生医療の現状と将来展望」—

治療抵抗性末梢動脈疾患 (PAD) に対する再生医療を
応用した先進併用療法宮本 正章^{1,2} 高木 元² 太良 修平² 高野 仁司²
高木 郁代² 安武 正弘² 水野 杏一²¹日本医科大学付属病院再生医療科²日本医科大学大学院医学研究科器官機能病態内科学Advanced Combination Therapy Using Regenerative Medicine
for No Optional Peripheral Arterial Disease (PAD)Masaaki Miyamoto, Gen Takagi, Shuhei Tara, Hitoshi Takano,
Ikuyo Takagi, Masahiro Yasutake and Kyoichi Mizuno¹Department of Regenerative Medicine, Nippon Medical School²Division of Cardiology, Hepatology, Geriatrics, and Integrated Medicine, Department of Internal Medicine,
Graduate School of Medicine, Nippon Medical School

はじめに

人口の高齢化, 生活習慣病などにより末梢動脈疾患 (PAD) は増加し, その結果, 現行の治療法に抵抗性の難治性足潰瘍・壊疽患者も急増している. この病態の特徴としては多因子が関与しており, 糖尿病による易感染性, 創傷治癒遅延や, 長期間の抗生剤治療によるメチシリン耐性ブドウ球菌 (Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*: MRSA), 多剤耐性緑膿菌 (Multiple-Drug-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa*: MDRP) などの多剤耐性菌の繁殖合併による, 足趾潰瘍・壊疽から蜂窩織炎, 筋膜炎, 骨髄炎が進行し, さらに下肢血流の悪化が合併すると特に予後が悪く, 患肢大切断へと至る症例が増加してきている. よってこれら最重症症例の治療には, 血流改善, 感染制御, 創傷治癒の3要因を同時に総合的に治療することが必須となる. この包括的治療のために1) 自己骨髄幹細胞による血管新生療法¹ (先進医療承認), 2) 自己骨髄幹細胞浸透人工真皮による新しい組織再生法²などを開発してきた. しかし, これら新治療法の有効性が明らかになるにつれ, 患肢大切断の原因のほとんどは感染増悪であり, 感染制御の重要性を認識した. このため著者らは, 壊死組織除去, 感染制御, 健康肉芽増生

効果を有する医療用無菌ウジによるマゴットセラピーを導入し, さらに東京都内においては現在3台しか稼動していない第2種高気圧酸素治療装置を使用した高気圧酸素療法 (Hyperbaric Oxygen Therapy: HBO) を併用する再生医療を応用した先進併用療法を開発した. これら1) マゴットセラピー, 2) HBO, 3) 自己骨髄幹細胞による血管新生療法の内いずれか2つ以上を併用した先進併用療法により, 前医で患肢大切断と診断されたりあるいは治療法がないと診断された治療抵抗性症例 (no optional patients) 118例中104例 (88.1%) が自立歩行により退院し, 有効性を確認した.

本稿では, 中でも重症下肢虚血 (CLI) に対する自己骨髄幹細胞を用いた血管新生療法の実際について述べる.

自己骨髄幹細胞による血管新生療法

1997年に成人末梢血中にも Endothelial Progenitor Cells (EPCs: 血管内皮前駆細胞) が存在することが発見され¹, 血管発生に関する従来の Angiogenesis (血管新生) に加え, Vasculogenesis (脈管発生) という新しい概念が生まれた². これを活用し末梢血よりもさらに豊富なEPCsを含み, 各種サイトカイン (cytokine cocktail) の豊富な骨髄より自己骨髄細胞を採取し, 骨髄液分離装置を使用して単核球・血小板層を分離・濃縮し, 患者自身の虚血患肢の筋肉内に注射する新治療法が, わが国で開発された. 2000年よ

E-mail: miyamoto-m@nms.ac.jp

Journal Website (<http://www.nms.ac.jp/jmanms/>)

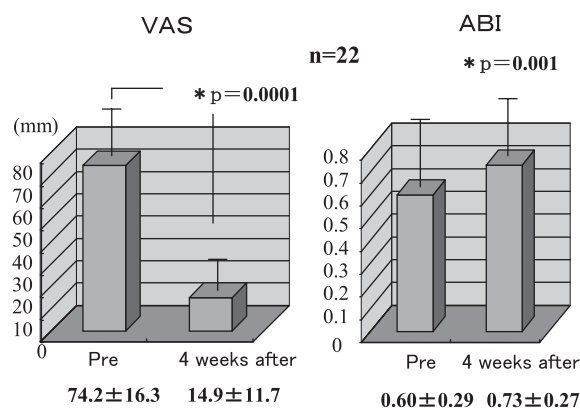
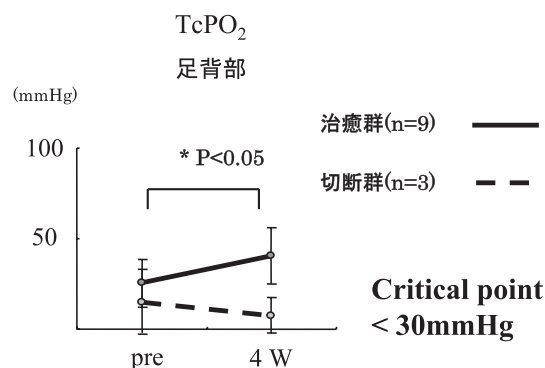


図1 VAS法による最大疼痛値, ABIの変化

図2 経皮酸素分圧測定 (TcPO₂) の変化

り PAD である Buerger 病, 閉塞性動脈硬化症 (ASO) に対する臨床研究の有効性が報告された (TACT trial)³. その後実施施設の増加により, 安全性・有効性が確認され, わが国の再生医療分野初的高度先進医療に承認された (現在は先進医療に名称変更).

2002 年 4 月より当院でもこの臨床研究に参加し, 現行のいかなる内科的・外科的治療でも治癒しない最重症の治療抵抗性 PAD に対して本療法を現在まで 47 例実施し, その 42 例 (89.4%) に有効性を確認している⁴ (現在東京都内病院で先進医療下実施中は当院のみ).

症例選択

20 歳から 80 歳までで Fontaine 分類 III~IV 度, 内科的・外科的治療法いずれにおいても治癒しない Buerger 病, ASO, 糖尿病性潰瘍・壊疽症例に対し, 5 年以内の悪性腫瘍の既往および増殖型糖尿病性網膜症の存在が無いことを確認し, 同意の上実施している.

必須術前検査

一般血液検査に加え, 悪性腫瘍チェック (腫瘍マーカー: CEA, CA19-9, AFP, 上部消化管内視鏡検査等), 心臓・脳虚血検査 (心臓冠動脈造影, 運動負荷検査, 頭部 MRI, 負荷 RI など)

臨床評価

治療前, および 4 週後に VAS (visual analog scale) を用いた痛み測定, DSA (digital subtraction angiography), ABI (ankle-brachial pressure index), 経皮的酸素分圧 (TcPO₂: transcutaneous oxygen pressure), サーモグラフィー, treadmill での無痛歩行距離および時間, ^{99m}Tc-Tetrofosmin (TF) perfusion Scintigraphy を施行.

自己骨髓細胞採取および移植法

全身麻酔下, 腹臥位にて両側腸骨より骨髓細胞液 500mL を採取. 血液分離装置 AS TEC 204 (Fresenius Germany) を使用して, 骨髓単核球と血小板の細胞層を採取し, 最終量を 60~80mL に濃縮し, ただちに 24~26G シリンジで虚血下肢およびデブリードマン後の潰瘍周辺に筋注した.

結果

Buerger 病 12 例, ASO 26 例, 膠原病 9 例の計 47 例に対して施行した. 平均年齢は, 63.2 ± 3.4 歳 (男性 32 名, 女性 15 名) で, Fontaine 分類では, 89.4% が IV 度 (42/47 例) を占め, 糖尿病は 51.1% (24/47 例) に合併しており, 血液透析症例は 23.4% (11/47 例). すべての症例が他院および他科よりの紹介であった.

初期の 22 例における痛みの程度は, 視覚的アナログ VAS にて, 術前 74.2 ± 16.3 (mm) より術後 4 週で 14.9 ± 11.7 (mm) と著明に改善していた (p = 0.0001, 図 1). 患肢虚血状態のうち, ABI は術前 0.60 ± 0.29 から術後 4 週で 0.73 ± 0.27 (p = 0.001, 図 1) と改善した. 術前歩行可能で測定可能であった症例での無痛歩行時間は, 術前 140 ± 53 秒から術後 4 週で 451 ± 74 秒と大幅に改善した. (p = 0.034). 経皮酸素分圧 (TcPO₂) は, 100% O₂ 5 分間吸入後, 最大経皮酸素分圧 (Max · TcPO₂) 検査により, 骨髓幹細胞による血管新生治療後の予後予測が可能であり, 30mmHg にクリティカルポイントが存在した (図 2).

本血管再生治療の客観的血流評価として, 定量的であり最も有効であると考えられる ^{99m}Tc-TF perfusion scintigraphy では, 患肢膝関節より下部から足関節までの近位部と足関節から趾末端までの遠位部とした検討では, 近位部は術前 1.18 ± 0.39 pixel から術後 4 週では 1.35 ± 0.50 pixel, (p = 0.005 図 3) と有意に

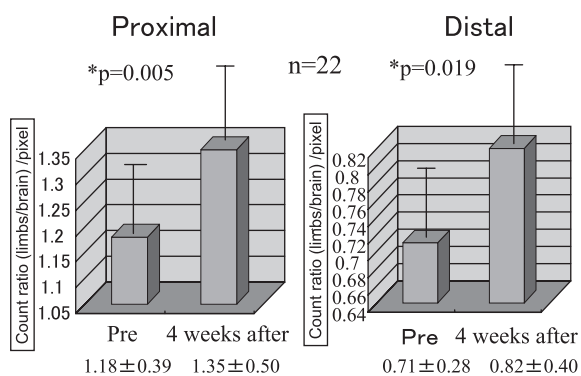
^{99m}Tc -tetrofosmin (TH) Perfusion Scintigraphy

図3 ^{99m}Tc -Tetrofosmin (TF) perfusion Scintigraphy
近位部（膝関節から足関節部まで）と遠位部
（足関節部から足先端まで）の量的変化

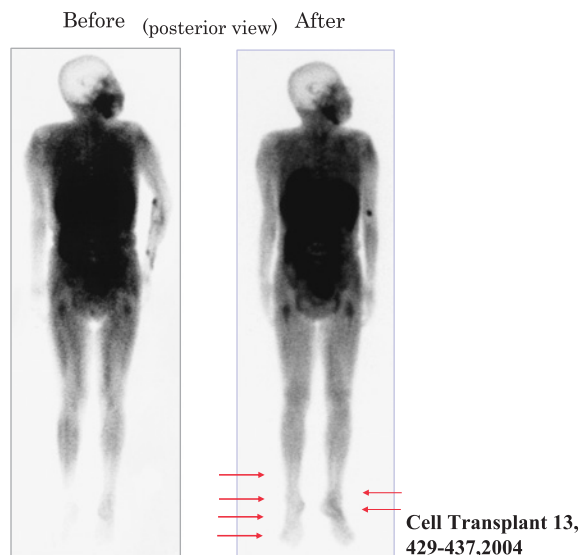


図4 ^{99m}Tc -Tetrofosmin (TF) perfusion Scintigraphy
(Miyamoto M et al: Cell Transplant 2004; 13:
429-437)

DSA



図5 DSA (digital subtraction angiography)

上昇した。遠位部では 0.71 ± 0.28 pixel から 0.82 ± 0.40 へと上昇した ($p=0.019$, 図3, 4)。また、4週後の DSA において新しい側副血行路が確認された症例もあった(図5)。71歳糖尿病壊疽症例を図6に提示した。前大学病院で膝下切断と診断され、当科に転院となったが、自己骨髄幹細胞による血管新生療法と共に欠損部が広範に渡ったため自己骨髄幹細胞浸透人工真皮による組織再生法を併用して、自立歩行により退院した。

採取された自己骨髄細胞数は 2.4×10^9 から 6.1×10^9

細胞（平均 $4.03 \pm 0.31 \times 10^9$ 細胞）であり、採取率は $46.2 \pm 7.1\%$ であった。Fluorescence activated cell sorting analyses では、endothelial lineage cells の機能を持つとされる $\text{CD}34^+$ cells は、 $1.93 \pm 0.26\%$ ($\text{CD}34^+$ cells/Total Events) であった。

考 察

現行のいかなる内科的および外科的治療法でも治癒しない治療抵抗性 PAD に対して本療法を施行し、有

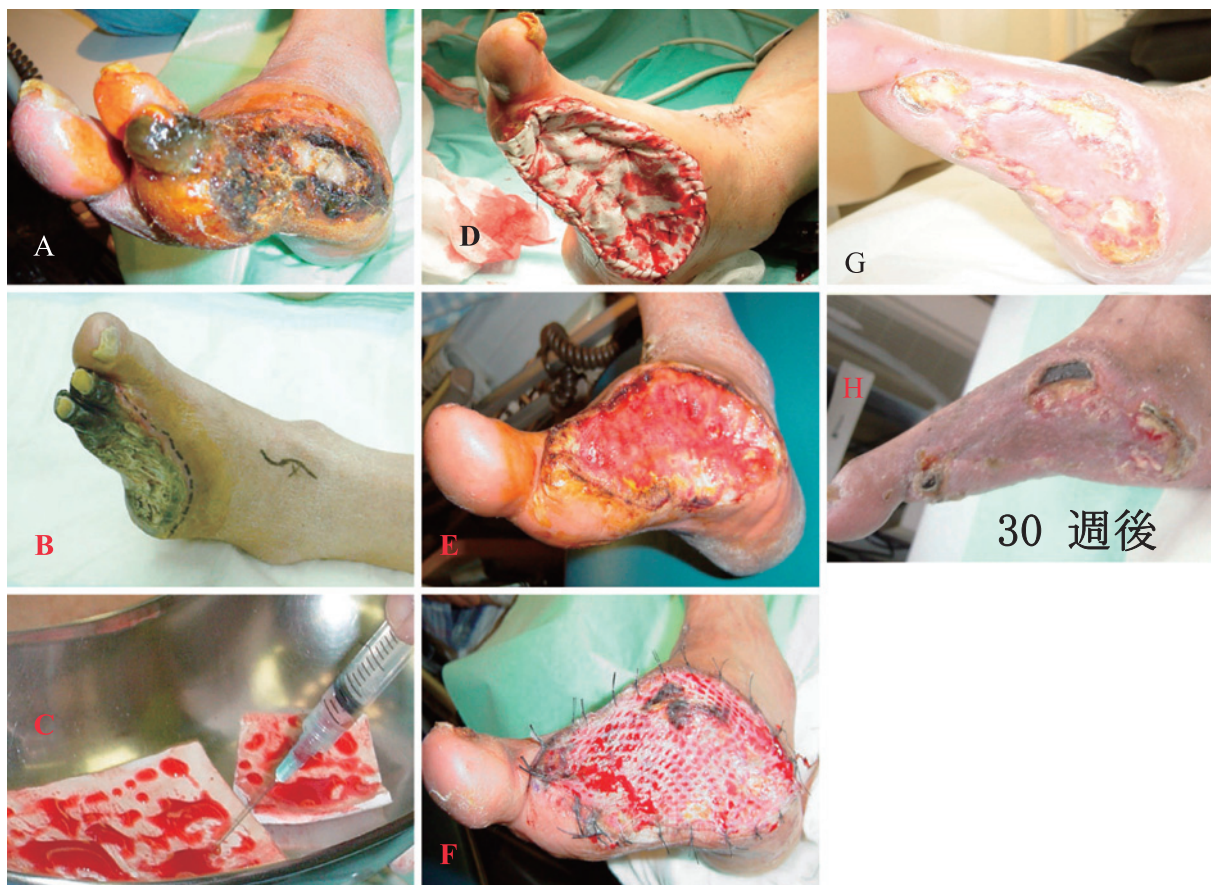


図6 71歳糖尿病壊疽症例，自己骨髄幹細胞浸透人工真皮による組織再生法併用自己骨髄幹細胞による血管新生療法

効性を証明した⁴。

本治療法は，痛みに対しては極めて有効であり，安静時痛はほとんどの症例で消失した。特に Buerger 病に対しては有効であり，2 カ月後にはすべての症例（12 例）で疼痛は消失した。この理由として虚血部位での側副血行の増加による局所血流の増加のみではなく，未知の鎮痛因子の可能性を示唆した。これは，自己骨髄細胞の採取にあたり，EPCs 分離による CD34 陽性細胞のみの選択的分離・濃縮ではなく，骨髄に豊富な VEGF，b-FGF などの増殖因子の cytokine cocktail 層の同時投与が寄与していると考えられる。すべての症例で患者は満足され，Fontaine IV 度症例では前医で膝下切断術を診断されていたが，本療法の結果，痛みが除去され全例が切断せず，患肢温存され自力歩行で退院した。

有効性および新生血管の客観的，定量的評価法は確立していない。Yuyama ら³は，angiogenesis の客観的評価法として，ABI，treadmill test における無痛歩行時間および TcPO₂ が有効であったと述べているが，著者らの検討でも，ABI，treadmill test における無痛歩行時間では有効であった。^{99m}Tc-TF perfusion

scintigraphy は，^{99m}Tc-methoxyisobutylisonitrile (MIBI)^{5,6} あるいは ²⁰¹TlCl perfusion scintigraphy⁷ に比し虚血肢への集積性への不均一性が少なく，動的小および静的イメージに優れている。著者らの検討では，近位部で血流は血管新生療法後約 14% 増加しており，血管再生治療評価の有効な方法と考えられた。本療法の副作用は，47 例中 4 例で筋注部位の疼痛があったが，5 日以内に消失した。

まとめ

著者らは，治療抵抗性 PAD 47 症例に対して自己骨髄幹細胞による血管新生療法を施行し，その有効性と安全性を示した。そして，血流増加の客観的かつ定量的に評価法として TF perfusion scintigraphy の有用性を報告した。自己骨髄幹細胞による血管新生療法は，limb salvage のための新しい戦略となりうると考えた。

現在著者らは，本成績を応用し，難治性糖尿病性潰瘍・壊疽に対する骨髄幹細胞浸透人工真皮による新しい組織再生法や，心臓移植以外治療法のない重症難治

性虚血性心疾患（重症狭心症，陳旧性心筋梗塞）に対する心臓血管新生療法 10 例を実施し，良好な結果を確認している。また，厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「骨髄幹細胞移植による難治性血管炎への血管再生医療に関する多施設共同研究」に分担研究者として参加し，膠原病（強皮症）に対する適応拡大を図り，先進医療申請を予定している。

謝辞：本研究の一部は，文部科学省科学研究費基盤研究 C（#12671153 and #15590695）および平成 14 年度東京都医師会グループ研究賞によって実施された。

文 献

1. Asahara T, Murohara T, Sullivan A: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-967.
2. Asahara T, Masuda H, Takahashi T: Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 85: 221-228.
3. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 427-435.
4. Miyamoto M, Yasutake M, Takano H, Takane T: Therapeutic angiogenesis by autologous bone marrow cell implantation for refractory chronic peripheral arterial disease using assessment of neovascularization by ^{99m}Tc-tetrofosmin (TF) perfusion scintigraphy. *Cell Transplant* 2004; 13: 429-437.
5. Celen YZ, Zincirkeser S, Akdemir I: Investigation of perfusion reserve using ^{99m}Tc(m)-MIBI in the lower limbs of diabetic patients. *Nucl Med Commun* 2000; 21: 817-822.
6. Miles KA, Barber RW, Wraight EP: Leg muscle scintigraphy with ^{99m}Tcm-MIBI in the assessment of peripheral vascular (arterial) disease. *Nucl Med Commun* 1992; 13: 593-603.
7. Segall GM, Lang EV, Lennon SE: Functional imaging of peripheral vascular disease: a comparison between exercise whole-body thallium perfusion imaging and contrast arteriography. *J Nucl Med* 1992; 33: 1797-1800.