

特集【ここまで来た再生医療】

重症難治性心血管疾患に対する自己骨髄細胞
移植血管再生治療の現状宮本 正章¹ 安武 正弘¹ 高野 仁司¹ 高木 元¹ 高木 啓倫¹
水野 博司² 汲田伸一郎³ 落 雅美⁴ 坂本 篤裕⁵ 高野 照夫¹¹日本医科大学内科学第1教室, ²形成外科学教室, ³放射線医学教室, ⁴外科学第2教室, ⁵麻酔科学教室Present Status of Therapeutic Angiogenesis by Autologous Bone Marrow Cell Implantation
for Refractory Chronic Peripheral Arterial Disease and Ischemic Heart DiseaseMasaaki Miyamoto¹, Masahiro Yasutake¹, Hitoshi Takano¹, Gen Takagi¹,
Hiromichi Takagi¹, Hiroshi Mizuno², Shinichiro Kumita³, Masami Ochi⁴,
Atsuhiko Sakamoto⁵ and Teruo Takano¹¹First Department of Internal Medicine, ²Department of Plastic Surgery,³Department of Radiology, ⁴Second Department of Surgery, ⁵Department of Anesthesiology, Nippon Medical School

はじめに

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, 血管の発生に関して今までの Angiogenesis(血管新生)という概念に加え, Vasculogenesis(脈管発生)という新しい概念が生まれた². この概念を活かしつつ, 末梢血よりもさらに豊富に EPCs が存在し, 各種サイトカインも豊富な (cytokine cocktail) 骨髄より自己骨髄細胞を採取し, 特殊な血液(骨髄)分離装置を使用して単核球・血小板層を分離・濃縮し, 自分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 2000年6月より慢性末梢動脈閉塞症である Buerger 病, 閉塞性動脈硬化症 (ASO), 糖尿病性潰瘍に対して臨床研究が開始され (TACT trial), その有効性が報告されている³.

我々も 2002年4月よりこの臨床研究に参加し, 20~79歳までの現在のいかなる内科的・外科的治療法にても治癒しない最重症の難治性慢性閉塞性末梢血管疾患の Buerger 病, 全身性強皮症 (PSS), 閉塞性動脈硬化症 (ASO), 糖尿病性潰瘍に対して本療法を現在まで 12例実施し, 全ての症例で自覚症状他覚所見が改善し⁴, そして, 心臓移植以外治療法のない重症難治性虚血性心疾患に対しても冠動脈バイパス術と併用して EPCs 移植による血管再生治療 3例実施, 成功した. さらに, 重度の難治性糖尿病性壊疽及び動脈硬化症により他院で膝下よりの患肢切断を宣告された症例に対し, 疼痛の完全除去, 自立歩行可能とする, EPCs

を浸透させた人工真皮を移植した新しい創傷治療法を開発した⁵.

症例選択

日本医科大学付属病院倫理委員会及び日本医科大学倫理委員会の2つの倫理委員会の承認を受け, 20歳から79歳までで Fontaine 分類 III 度, IV 度を呈し, 現行のいかなる内科的・外科的治療法にても治癒しない Buerger 病, 閉塞性動脈硬化症 (ASO), 糖尿病性潰瘍・壊疽症例に対して, 5年以内の悪性腫瘍の存在及び増殖型糖尿病性網膜症の存在が無いことを確認の上, 2回以上の informed consent の上実施した.

術前検査及び評価

(1) 生化学的検査 (HbA1c を含む), (2) 悪性腫瘍チェック (腫瘍マーカー: CEA, CA 19-9, AFP 等), (3) 心臓冠動脈造影 (CAG), (4) 上部消化管内視鏡検査, (5) 心臓および腹部超音波検査 (US) を必須術前検査としており, さらに evaluation study として前, 及び 4 週後に (1) VAS (visual analog scale) を用いた痛み測定, (2) DSA (digital subtraction angiography), (3) ABI (ankle-brachial pressure index), (4) 経皮的酸素分圧 (TcO₂: transcutaneous oxygen pressure), (5) サーモグラフィー, (6) treadmill test での無痛歩行距離及び時間, (7) ^{99m}Tc-Tetrofosmin (TF) perfusion Scintigraphy を施行した.

^{99m}Tc-Tetrofosmin (TF) perfusion Scintigraphy 55~740 MBq の ^{99m}Tc-ethylenebis [bis(2-ethoxyethyl) phosphine] (^{99m}Tc-tetrofosmin) を静注した約 10 分後, dual-head large field-of view ガンマカメラ

表1 自己骨髄細胞移植による血管再生治療 12 例の内訳

Case	Age & Sex	Diagnosis	Lesions	Fontaine	Cell Implantation (cells)	Outcome (4 weeks)
1	44 M	Buerger's	Rt. Limb	IV	4.5×10^9	Limb was saved. Partial amputation from PIP joint of first toe due to original osteomyelitis
2	56 F	PSS	Blt. Fingers	IV	3.8×10^9	Refractory ulcers were completely recovered with no rest pain, but after 9 months relapsed
3	56 M	Buerger's	Blt. Limbs (Lt > Rt)	IV	2.4×10^9	Ulcer was recovered, no symptoms
4	45 M	Buerger's	Blt. below ankles (Lt < Rt)	IV	2.5×10^9	Ulcer was recovered, no symptoms
5	67 F	ASO + DM	Blt. Limbs (Lt < Rt)	IV	4.7×10^9	$^{99m}\text{Tc-TF}$ increased 75%, Fontaine class changed from IV to I
6	69 M	Buerger's	Rt. Limb & Rt hand	IV	4.3×10^9	Fontaine class changed from IV to I, ABI increased + 0.1
7	71 M	DM gangrene	Lt. Limb	IV	6.1×10^9	Limb was saved. Limb's temperature increased + 3
8	45 M	Buerger's	Blt. Limbs (Lt < Rt)	III	4.7×10^9	Pain-free walking time increased from 1' 10" to 10' 00"
9	64 M	DM gangrene, HD	Blt. Limbs (Lt < Rt)	IV	4.2×10^9	Limb was saved. ABI increased + 0.26
10	63 F	DM ulcer, HD	Lt. Limb	IV	2.7×10^9	Ulcer was recovered, Fontaine class changed from IV to II a
11	78 F	ASO, RA (steroids +)	Rt. Limb	IV	4.6×10^9	Limb was saved. ABI increased + 0.17
(12)	74 M	ASO	Rt. Limb	IV	3.9×10^9	Post-evaluation studies were omitted due to spondylolisthesis and rt. aseptic necrosis of the femoral head

(Vertex, ADAC) を用いて腹臥位で全身の前後像を撮影した。各々のガンマカメラの頭部には, high-resolution, low energy collimator が装着されており, スキャンスピードは 12 cm/min で, image acquisition time は, 約 15 分であった。データは $512 \times 1,024$ matrix, ^{99m}T 140 KeV photopeak で得られた。全身前後像は, quantitative analysis が施行され, 対象領域 ROI: region of interest) は, 筋肉組織とほぼ等しく描出され, さらに脳内摂取率をバックグラウンドとして計算した。そして muscle-to-brain (M/B) ratio は以下のごとく規定した⁶⁾ :

$M/B \text{ ratio} = \text{average counts per pixel in each muscle} / \text{average counts per pixel in the brain}$

自己骨髄細胞採取及び移植法

EPCs の mobilization のため pravastatin 10 mg を服用の上, 全身麻酔下に腹臥位にて両側腸骨より骨髄細胞液 500-600 ml を採取した。500 μl 及び 200 μl のフィルター後, 血液分離装置 AS TEC 204 (Fresenius, Germany) を使用して, 骨髄単核球と血小板の細胞層を採取し, 最終収量は, 60~80 ml に濃縮した。ただちに 24~26 G シリンジで虚血下肢及び debridement 後の潰瘍周辺に計 60-100 カ所筋注した。

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を用いた新しい創傷治療法

あらゆる治療法により半年以上治癒不能の難治性糖尿病性潰瘍・壊疽 3 例に対して, 本治療施行中に, 部分切断, debridement 後, その欠損部に骨髄幹細胞を浸透させた人工真皮 (terudermis[®]: テルモ社製) を 4-0 nylon で縫着した。1 例は術前より存在した MRSA 感染症により感染し脱落したものの 2 例は生着し, 極めて速い創傷治癒を呈した (図 7)。

結 果

2004 年 4 月より慢性末梢動脈閉塞性疾患に対して本療法を開始し, Buerger 病 5 例, 閉塞性動脈硬化症 (ASO) 3 例, 糖尿病性潰瘍・壊疽 3 例, 進行性全身硬化症 (PSS) 1 例の計 12 例に対して施行した (表 1)。平均年齢は, 61.0 ± 3.4 歳 (男性 8 名, 女性 4 名) で, Fontaine 分類では, 92% が IV 度 (11/12 例) を占め, 糖尿病は 33% (4/12 例) が合併していた。全ての症例が他院及び他科よりの紹介であった。しかし, 1 例 (case 12: すでに左肢は他大学で膝下より切断済) のみ, 術前より存在した右大腿骨頭特異性壊死及び第 2~4 頸椎すべり症のため歩行不能となり, 術後検査が施行不可能となり検討から除外した。本人及び家族

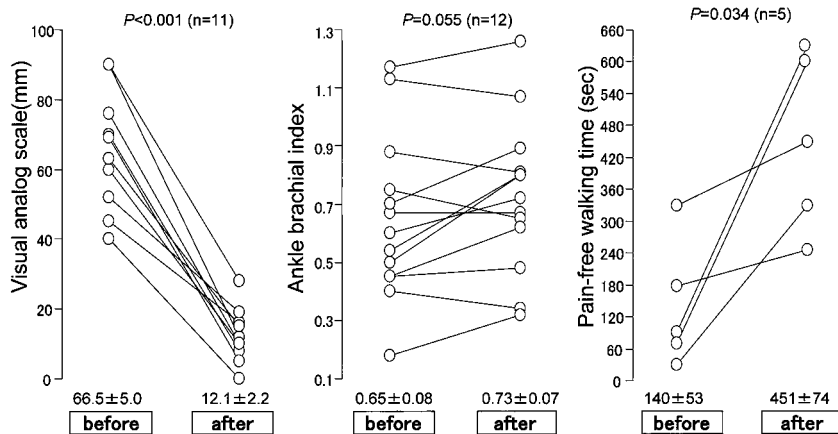


図1 VAS法による最大疼痛値，ABI と treadmill test での無痛歩行時間の変化

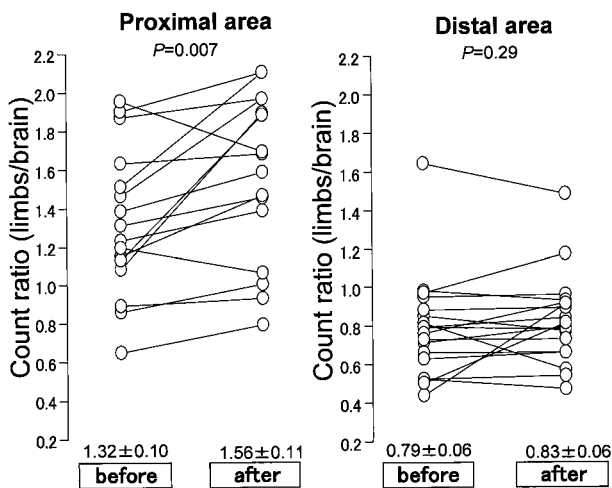


図2 ^{99m}Tc-Tetrofosmin(TF)perfusion Scintigraphy 近位部(膝関節から足関節部まで)と遠位部(足関節部から足先端まで)の量的変化

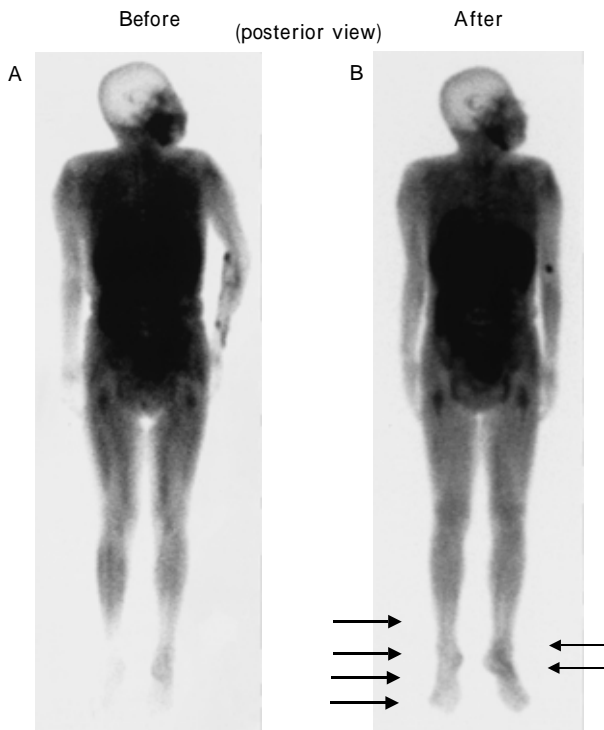


図3 ^{99m}Tc-Tetrofosmin(TF)perfusion Scintigraphy : 集積部 A : 術前 B : 術後 4 週

の強い希望で、適応を誤った症例であり反省している。

痛みの程度は、視覚的アナログ(visual analog scale: VAS)にて定量的に検討したが、術前 66.5 ± 5.0 (mm) に対して術後 4 週で 12.1 ± 2.2 (mm) と著明に低下していた($p < 0.001$, 図 1)。患肢虚血状態は、ABI(ankle-brachial pressure index), treadmill test での無痛歩行距離及び時間、^{99m}Tc-TF perfusion scintigraphy で検討された。ABI は、術前 0.65 ± 0.08 から術後 4 週で 0.73 ± 0.07 ($p = 0.055$, 図 1) と改善した。足肢及び手指の安静時疼痛は、11/12 例 92% で除去された。術前歩行可能で測定可能であった症例での treadmill test における無痛歩行時間は、術前 140 ± 53 秒から術後 4 週で 451 ± 74 秒と大幅に改善した($p = 0.034$, 図 1)。経皮的酸素分圧(TcO₂: transcutaneous oxygen pressure)は、著明改善例もあるものの、施行症例数が少なく統計処理を行わなかった。

我々が本血管再生治療の客観性評価、定量性の指標

として最も有効であると提唱する^{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、近位部術前 1.32 ± 0.10 から術後 4 週では 1.56 ± 0.11 ($p = 0.007$ 図 2, 3) と有意差を持って上昇した。^{99m}Tc-TF perfusion scintigraphy 遠位部での検討では、 0.79 ± 0.06 から 0.83 ± 0.06 へと上昇した($p = 0.29$, 図 2, 3)。サーモグラフィによる検討では、11 例中 5 例が局所皮膚温度の上昇を認めた(図 4, 表 1 case 9)。また、4 週後の digital subtraction angiogra-

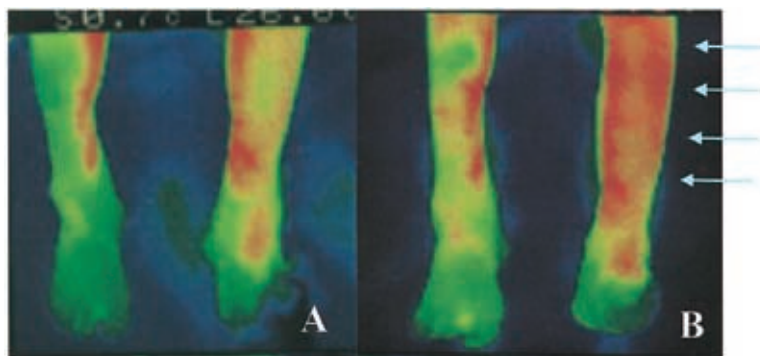


図4 サーモグラフィー (表1 症例7) 下肢温度+3 上昇

phy (DSA) において新しい側副血行路が確認された (図5, 表1 case 6).

採取された自己骨髄細胞は, 2.4×10^9 細胞から 6.1×10^9 細胞であり, 平均移植細胞数は, $4.03 \pm 0.31 \times 10^9$ 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 CD 34⁺ cells は, $1.93 \pm 0.26\%$ (CD 34⁺ cells/Total Events) であった.

考 察

現行のいかなる内科的及び外科的治療法でも治癒しない難治性の慢性末梢動脈閉塞性疾患に対して本療法を施行し, 有効性を証明した⁴.

本治療法は, 痛みに対しては極めて有効であり, VAS による評価でも約5分の1に減少し, 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カ月後には全ての症例で疼痛は消失していた. 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, 未知の鎮痛因子の存在があるかもしれない (未発表データ: しばしば granulocyte-colony stimulating factor: G-CSF のみの投与でも鎮痛が得られることがある) 我々は, 自己骨髄細胞の採取・濃縮にあたり, EPCs の in site differentiation のみではなく, 骨髄に豊富な VEGF, b-FGF 等の増殖因子の cytokine cocktail の重要性も認識し, CD 34 positive cells のみ採取する selective な分離・濃縮は行っていない.

全ての症例で患者は満足され, 12例中5例では, 前医で膝下よりの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, 症例12を除いて全て自力歩行で退院した.

本治療法の有効性を評価するため, 客観的でも定量化可能な評価法は難しい. 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及び経皮的酸素分圧 (TcO₂) が有効であったと述べているが, 我々の検討では, ABI, treadmill test における無痛歩行時間では有効性

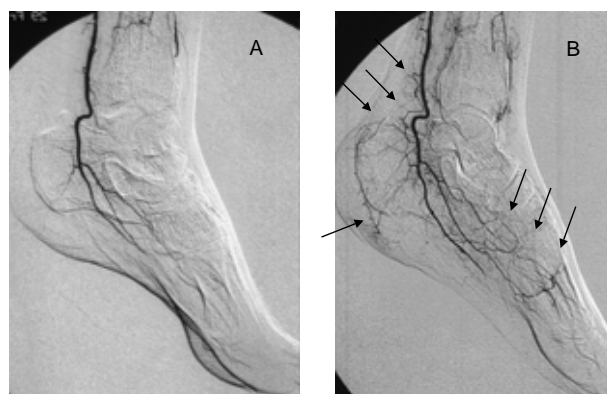


図5 DSA (digital subtraction angiography)
A: 術前 B: 術後4週
: 新しい側副血管

が示唆されたものの, TcO₂ は, 測定センサーの接触の問題, 測定条件等により有効ではなかった.

そのため我々は, これらに変わる定量可能な客観的指標として, ^{99m}Tc-TF perfusion scintigraphy に注目した. 元々 ^{99m}Tc-methoxyisobutylisonitrile (MIBI)⁸ 或いは ²⁰¹TlCl perfusion scintigraphy⁹ が用いられていたが, 虚血肢への集積性への不均一性が指摘されており, 動的及び静的イメージに優れ, 不均一性も最も少ないとされる ^{99m}Tc-TF を使用した. 我々の検討では, 全体後面像において9/11例で近位部では増加していた. この血流分析法は, 血管再生治療による最も有効な方法と考えられた.

また, 我々は, 初めて膠原病である PSS に対して本血管再生治療を応用した. 56歳女性で10年以上難治性の有痛性指端潰瘍に悩まされ (すでに左第IV指は切断済), 鎮痛剤と睡眠剤が欠かせず, ステロイド治療及び免疫抑制治療は施行されていなかった. 本治療後6週間で, 完全除痛と共に, 9指すべての潰瘍が完全にきれいに治癒した. しかし, ステロイド治療および免疫抑制治療は施行せず継続し, 原疾患の原因除去は施行されていなかったため, 9カ月目に潰瘍が再発した (図6).

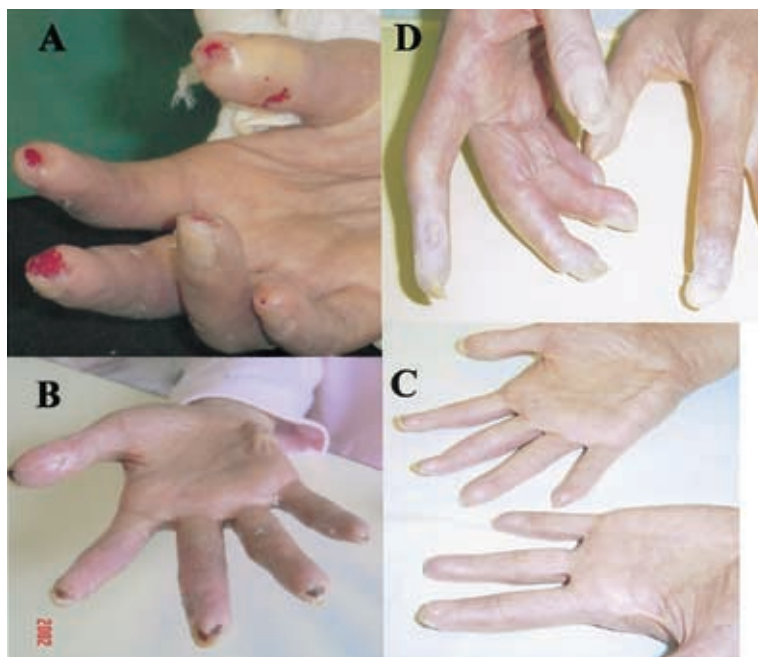


図6 56歳女性 PSS症例(表1 症例2)
 両手指の難治性潰瘍が10年以上継続(左2指はすでに他大学で切断)
 A: 術前(難治性潰瘍と著明な安静時痛). B: 移植後3週後. C: 移植後8週後. 全ての潰瘍は、完全に治癒し、安静時痛も完全に消失した. D: 9カ月後潰瘍再発.

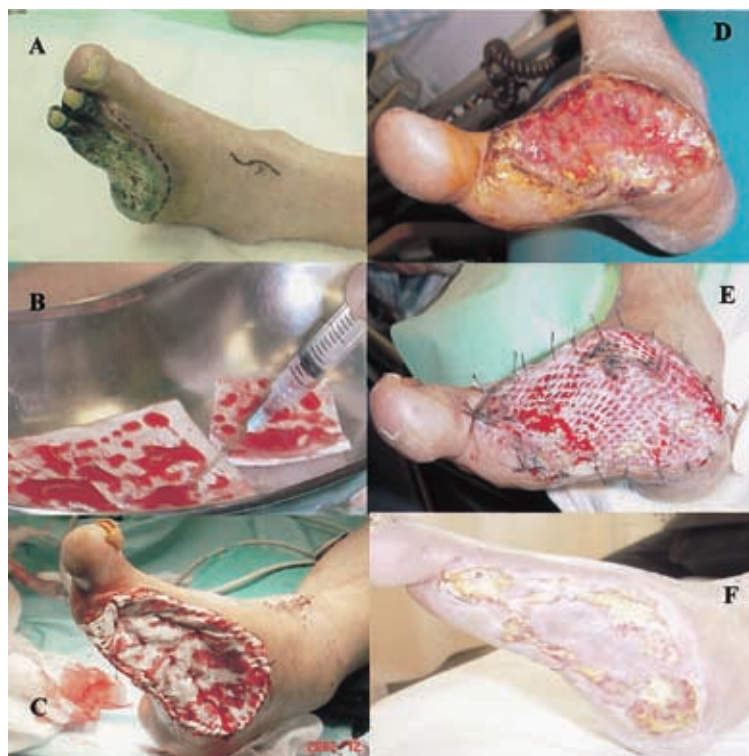


図7 骨髄幹細胞浸透人工真皮を用いた新しい創傷治癒法(表1 症例7)
 A: 移植前, 71歳, 男性. 糖尿病性壊疽. すでに他大学で左第4, 5趾の切断術を受け, 膝下からの切断を診断されるも強く拒否し, 当院受診となる. B: コラーゲン層に骨髄細胞を浸透. C: 壊死部の切除後骨髄幹細胞浸透人工真皮を逢着. D: 術後26日, 健康肉芽が速やかに成長. E: 術後46日, 自己皮膚移植施行. F: 術後70日, 中心部の皮膚は生着している. 自立歩行可能.

本療法の副作用に関連して、11例中2例で筋注部位の局所的炎症(発赤, 腫脹, 軽度熱感)があったが、7日以内に発赤は消失した。さらに我々は、炎症性サイトカインであるIL-1 β , IL-1 RA, IL-4, IL-6, IL-8, TNF- α , nitric acid ion と高感度CRPを術前日及び術後1日及び7日に測定した。IL-6と高感度CRPのみ術後1日に上昇していた(前のIL-6平均値: 6.7 pg/ml, 術後1日のIL-6平均値 16.6 pg/ml), しかし、術後7日には全ての炎症性サイトカインは前値に戻っていた。

我々は、難治性の糖尿病壊疽症例において壊死部の部分切除或いはdebridement後の欠損部に対して、自己骨髄幹細胞による血管再生治療と同時に、分離・濃縮した自己骨髄幹細胞を人工真皮に浸透させ、欠損部に達する新しい創傷治療法を開発した。この人工真皮は、外層はシリコン、内層はコラーゲンより成り、この内層のコラーゲン層に細胞を浸透させた。これは、コラーゲンが、scaffold(足場)として機能して健康肉芽の増殖を助長したと考えられる。3例施行し、1例(他科管理の症例)は術前より存在したmethicillin-resistant Staphylococcus Aureus(MRSA)感染症のため術後すぐに摘出したが、2例はきれいに生着し治癒期間の大幅な短縮をもたらした(図7)。難治性糖尿病性壊疽症例ではMRSA感染合併が多く、我々は術前よりMRSA感染が明瞭な症例では超酸性水による洗浄を連日施行している¹⁰が、感染例1例では、超酸性水での洗浄は施行していなかった。

まとめ

我々は、現行のいかなる内科的及び外科的治療法でも治癒しない難治性の慢性末梢動脈閉塞性疾患12例、19肢及び手に対して、自己骨髄細胞による血管再生療法を施行し、その有効性と安全性を示した。そして、治療された虚血下肢及び手指の血流増加を客観的にしかも定量的に評価する方法として^{99m}Tc-Tetrofosmin(TF) perfusion scintigraphyの有用性を報告した。治療不能な難治性慢性末梢動脈閉塞性疾患に対して自己骨髄細胞移植による血管再生療法は、limb salvageのための新しい戦略となりうると考えられた。

現在我々は、この難治性慢性末梢動脈閉塞性疾患に対する成功例を基盤にして、さらに一歩進め付属病院倫理委員会の承認のもと、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)に対しても冠動脈バイパス術と併用してEPCs移植による血管再生

治療をすでに3例実施し、良好な結果を確認している。

謝辞: 本研究の一部は、文部科学省科学研究費基盤研究Q(#12671153 #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, et al.: Isolation of purative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-967.
2. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al.: 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, Ikeda U, Shintani S, Masaki H et al.: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone marrow cells: a pilot study and a randomized controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 427-435.
4. Miyamoto M, Yasutake M, Takano H et al.: 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 in press
5. 宮本正章, 安武正弘, 高野仁司, 他: 重症難治性糖尿病性壊疽に対する自己骨髄幹細胞浸透人工真皮を用いた血管再生細胞治療. *Complication* 2003; 8: 31-37.
6. 木島鉄仁, 汲田伸一郎, 趙圭一, 隈崎達夫: 閉塞性動脈硬化症における^{99m}Tc-Tetrofosmin運動負荷下肢シンチグラフィ. *核医学* 1998; 35: 305-313.
7. Celen YZ, Zincirkeser S, Akdemir I, Yilmaz M: Investigation of perfusion reserve using ^{99m}Tc-MIBI in the lower limbs of diabetic patients. *Nuclear Medicine Communications* 2000; 21: 817-822.
8. Miles KA, Barber RW, Wraight EP, Cooper M, Appleton: Leg muscle scintigraphy with ^{99m}Tc-MIBI in the assessment of peripheral vascular (arterial) disease. *Nuclear Medicine Communications* 1992; 13: 593-603.
9. Segall GM, Lang EV, Lennon SE et al.: 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.
10. Miyamoto M, Inoue K, Gu Y: Effectiveness of Acidic Oxidative Potential Water in Preventing Bacterial Infection in Islet Transplantation. *Cell Transplant* 1999; 8: 405-411.