

## バージャー病の難治性潰瘍に対する骨髄細胞移植の治療効果

知久 正明 西上 和宏 林 富貴雄 荻野 均<sup>\*1</sup> 松田 均<sup>\*1</sup> 湊谷 謙司<sup>\*1</sup>  
佐々木啓明<sup>\*1</sup> 中谷 武嗣<sup>\*1</sup> 田口 明彦<sup>\*2</sup> 宮田 茂樹<sup>\*3</sup> 亀井 政孝<sup>\*4</sup>  
田中 良一<sup>\*5</sup> 盛 英三<sup>\*6</sup> 宮武 邦夫 友池 仁暢

**要 旨：**難治性の重症末梢動脈閉塞症に対し、骨髄細胞移植治療による血管再生療法が本邦を中心に開始されている。安静時疼痛や間歇性跛行に対しては、良好な効果が認められているが、虚血性潰瘍に対しての効果は不十分とされている。今回、3例のバージャー病の難治性潰瘍に対し、骨髄細胞移植治療を施行し、著明な改善を認めた。(J. Jpn. Coll. Angiol., 2004, 44: 191-197)

Key words: Autologous bone marrow mononuclear cell implantation, Therapeutic angiogenesis, Buerger's disease

### 序 言

血管再生は、一般に既存の血管から血管内皮細胞が増殖、リモデリングし、新しい娘血管枝が形成される狭義の血管新生(angiogenesis)と主に胎生期に行われる血管内皮前駆細胞である血管芽細胞が集合、分化して血管が形成される血管発生(vasculogenesis)の2つが考えられている。近年、成人の末梢血液中にも血管内皮細胞に分化しうる血管内皮前駆細胞の存在が明らかにされた。成人末梢血中のCD34陽性単核球の分画から血管内皮細胞へと分化しうる一群の細胞が得られることが証明された<sup>1)</sup>。すなわち、成人においてもvasculogenesisによる血管再生が起こりうることが示された。CD34陽性の単核球は末梢血液より骨髄液に多く含まれるため、動物実験において、虚血肢に対する骨髄単核球移植治療が施行され、良好な効果が報告された<sup>2)</sup>。これに基づき、本邦ではTACT studyを始めとして、臨床においても重症下肢虚血患者に対し自己骨髄

細胞移植や末梢血幹細胞移植が開始された<sup>3,4)</sup>。しかし、安静時疼痛や間歇性跛行に対しては、良好な効果が認められているが、閉塞性動脈硬化症に対する虚血性の皮膚潰瘍に対しての効果は不十分とされている。今回、バージャー病の難治性潰瘍に対する骨髄細胞移植治療の効果を検討した。

### 対 象

対象患者は、日常生活が著しく障害されている重症末梢動脈閉塞症で、他のいかなる治療にも反応せず今後回復が期待できなかった3症例。倫理審査委員会の審査のもと、詳細な説明文書にて十分に自己骨髄細胞移植治療で発生する合併症・効能・不利益・利益を説明し、患者みずからの意思および家族の理解と承諾に基づいて、骨髄細胞移植治療を希望する場合のみ施行するとした。治療前に、悪性腫瘍と網膜症のチェックを行い、これらの疾患を有する場合は対象から除外した(Table 1)。

### 方 法

薬物治療は試験期間を通じて継続し、易出血性を来す薬物は、手術前後一旦中止した。また、可能であれば、手術に先立ち自己末梢血を採取貯蔵し、手術中に返血した。

国立循環器病センター心臓血管内科

<sup>\*1</sup>同心臓血管外科

<sup>\*2</sup>同脳血管内科

<sup>\*3</sup>同輸血管理室

<sup>\*4</sup>同麻酔科

<sup>\*5</sup>同放射線科

<sup>\*6</sup>同心臓生理部

2004年1月22日受付 2004年4月23日受理

**Table 1** Indication of BM MNCs (bone marrow mononuclear cells) transplantation to peripheral artery disease in our hospital

| Indication                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• ASO or TAO</li> <li>• Fontaine grade III or IV</li> <li>• Sub-optimal indication to intervention because of peripheral and diffuse lesion</li> <li>• age: 20 to 80 years old</li> </ul>                                                                                                                      |
| Exclusion                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Severe retinopathy by diabetes mellitus or current malignancy</li> <li>• Life expectancy is considered less than one year due to complications</li> <li>• High-risk of general anesthesia operation</li> <li>• Informed consent was not obtained</li> <li>• The patient was considered unsuitable</li> </ul> |

ASO: arteriosclerosis obliterans, TAO: thromboangiitis obliterans

自己骨髄細胞移植は、全身麻酔下にて腸骨より800 ml 前後の骨髄液採取を行い、比重遠心分離法にて骨髄単核球を分離し、約50 mlの骨髄単核球液を得た。骨髄単核球液は、1 mlの注射器に分注し、23G針を用いて、虚血下肢骨格筋(前脛骨筋、後脛骨筋、腓腹筋部)に0.5 mlずつ約80カ所に筋肉内注射を行った。

## 結 果

症例1は31歳の男性。2001年1月頃から下肢の安静時疼痛を認め、右足4趾に皮膚潰瘍が出現した。2002年1月に右足3趾にも潰瘍が出現し、近医から当院に紹介され、2002年3月に精査加療目的で入院となる。喫煙歴は1日20本10年間、1年前より禁煙。Ankle brachial pressure index(ABPI)は右0.38、左0.56と両側肢とも低下し、血管造影にて両側下腿三分枝以下が閉塞し、末梢は発達した側副血行路で造影され、バージャー病と診断された。皮膚潰瘍は内科的治療で改善しないため、5月28日に自己骨髄細胞移植を施行した。末梢血管エコーにて、あらかじめ前脛骨動脈、後脛骨動脈、腓骨動脈に血管走行をマーキングし、それに沿って0.5 mlずつ、さらに、足底にも筋肉内注射した。投与された単核球数は $4.7 \times 10^9$ 個( $CD34^+ : 13.8 \times 10^7$ )であった(Table 2)。結果、ABPIは術後1週間で0.49まで改善したが、1カ月後には0.39まで低下し、さらにレーザードブラ、サーモグラフィー、arterial inflowでも改善しなかった(Fig. 1)。下肢血管造影でも、移植前後で明らかな変化は見られなかった(Fig. 2)。しかし

**Table 2** The number of injection cells

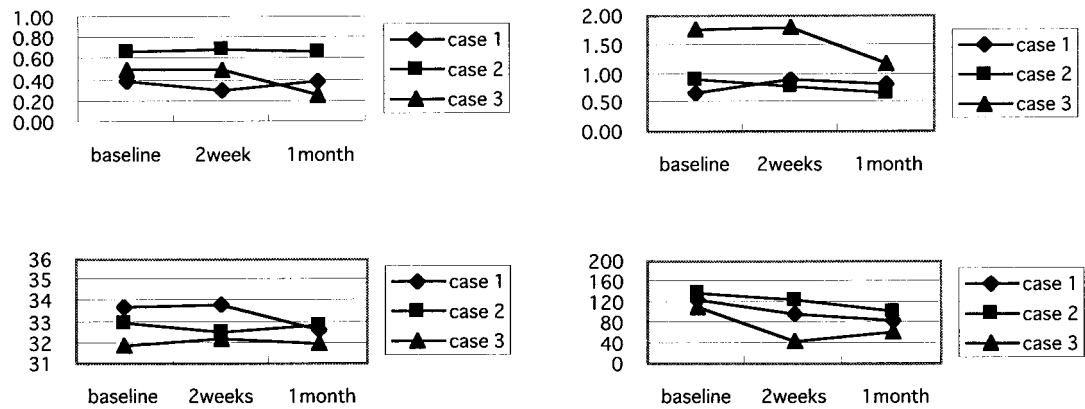
|        | MNCs              | CD34 <sup>+</sup>  |
|--------|-------------------|--------------------|
| Case 1 | $4.7 \times 10^9$ | $13.8 \times 10^7$ |
| Case 2 | $4.1 \times 10^9$ | $8.6 \times 10^7$  |
| Case 3 | $2.0 \times 10^9$ | $6.8 \times 10^7$  |

MNCs: mononuclear cells

ながら、術後1週で安静時疼痛が改善し、2週間で皮膚潰瘍が改善した(Fig. 3)。1年後の現在も経過良好である。

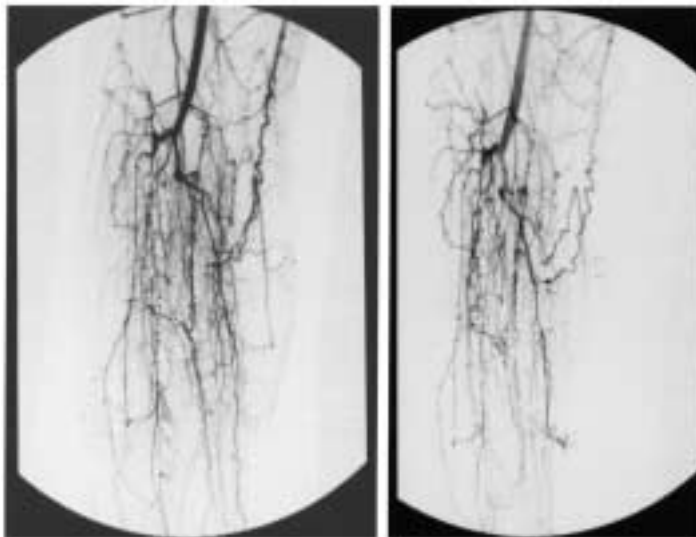
症例2は52歳の男性。1991年に当院にてバージャー病と診断された。2001年、左下肢の疼痛と第1～3趾に潰瘍を形成し、その後自然脱落した。潰瘍部の治癒傾向なく2002年10月加療目的で入院となる。喫煙歴は1日20本30年間、2年前から禁煙。ABPIは右1.18、左0.68。2002年11月25日に自己骨髄細胞移植を施行した。症例1と同様に、下腿筋および足底筋に投与された単核球数は $4.1 \times 10^9$ 個( $CD34^+ : 8.6 \times 10^7$ )であった(Table 2)。ABPIは術後1週間で0.70、1カ月後は0.67と変化しなかった(Fig. 1)。下肢血管造影でも有意な改善は見られなかった(Fig. 4)。術後2週頃から徐々に潰瘍が縮小し始め、全潰瘍部が上皮で覆われるのには3カ月かかった(Fig. 5)。

症例3は27歳の男性。2002年8月頃から左母趾痛を認めたが放置していた。同年10月に巻き爪による炎症と診断され、左母趾の爪先端部の一部を剥離・排膿さ



**Figure 1**  
A: Ankle brachial pressure index  
B: Laser Doppler( ml/min/100g )  
C: Thermograph( °C )  
D: Arterial inflow( ml/min )

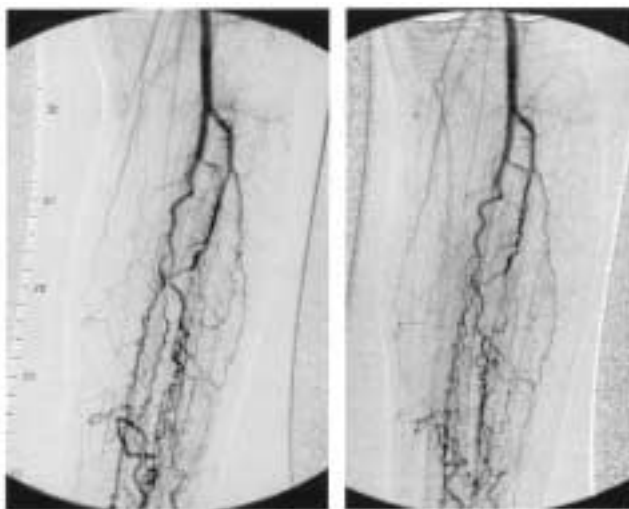
|   |   |
|---|---|
| A | B |
| C | D |



**Figure 2** Angiography.  
There were no significant changes between vessels condition in baseline (left) and those in one month after bone marrow implantation (right) in limb angiography.



**Figure 3** Skin ulcer.  
Ischemic skin ulcers were located on right 3rd and 4th toes in the first case (left). One month after the BM MNCs (bone marrow mononuclear cells) implantation, the ischemic skin ulcer improved (right).



**Figure 4** Angiography.  
There were no significant changes between vessels condition in baseline (left) and those in one month after bone marrow implantation (right) in limb angiography.

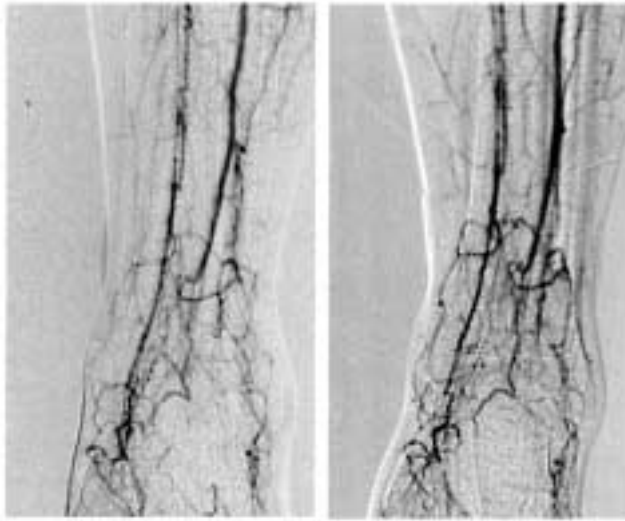


**Figure 5** Skin ulcer.  
Serious skin ulcers were observed in the left leg (left), with the toes disappearing. Three months after BM MNCs implantation, skin was ulcer completely cured (right).

れた。難治性潰瘍のためバージャー病が疑われ、血管造影が施行された。下腿三分枝以下の血管の閉塞を認めバージャー病と診断され当院紹介となる。喫煙は1日20本13年間、1年半前から禁煙。ABPIは右0.80、左0.50。2003年7月31日に自己骨髄細胞移植を施行し、症例1、2と同様に、下腿筋および足底筋に単核球数は $2.0 \times 10^6$ 個( $CD34^+ : 6.8 \times 10^7$ )であった( Table 2 )。ABPIは術後1週間で0.50、1カ月後は0.26と低下した( Fig. 1 )。下肢血管造影でも、有意な改善は見られなかった( Fig. 6 )。しかし、皮膚潰瘍は術後1週頃から徐々に縮小し、1カ月で上皮に覆われ、安静時疼痛も消失した( Fig. 7 )。

## 考 案

末梢動脈閉塞症は、閉塞性動脈硬化症(arteriosclerosis obliterans : ASO)とバージャー病の2つの疾患でほとんど占められる。これらに対する治療選択は薬物治療、カテーテル治療、外科的バイパス術、交感神経切除術が主な治療法である。当院における治療戦略として、比較的軽症例( Fontaine 分類I ~ II度)に対しては経皮的血管形成術を含めた内科的治療が主体となり、下腿切断となる症例は少ない。しかし、重症例( Fontaine分類III ~ IV度)では内科的、外科的治療では解決しきれず、約13%の症例に下腿切断が施行されている( Table 3 )。このように、血行再建が困難な重症例で



**Figure 6** Angiography.  
The number of vessels appeared to have increased in the angiographic image after the treatment (right) rather than baseline (left), but new vessels cannot be evaluated clearly in the images.



**Figure 7** Skin ulcer.  
There were skin ulcers in bilateral 1st toes (left). Right skin ulcer was completely cured and left skin ulcer also improved one month after the treatment (right).

は既存の治療法では限界があり，新しい治療戦略として血管再生治療が期待されている。Asaharaらは成人末梢血中の単核球分画に血管内皮細胞に分化しうる内皮前駆細胞の存在を報告した<sup>1)</sup>。単核球は主に骨髓に存在するため，骨髓単核球細胞移植をすることにより，血管新生や側副血行路が発達し，動物実験の虚血モデルで下肢血流量増加作用や心機能が改善することが確認された。これらの基礎および臨床結果に基づき，カテーテル治療や外科的バイパス術による血行再建が困難な重症末梢性動脈疾患に骨髓単核球細胞移植が臨床導入され，安静時疼痛の改善や歩行距離の増加など良好な効果が報告されている。近年，ASO症例は増加し，バージャー病は減少している( Table 4 )。このた

**Table 3** The trend of the patient with peripheral artery disease in our hospital (Jan. 2002 ~ Sep. 2003)

| Fontaine   | I & II (n = 114) | III & IV (n = 45) |
|------------|------------------|-------------------|
| age (y/o)  | 70.4             | 71.2              |
| CAD        | 33 (29%)         | 19 (42%)          |
| DM         | 47 (41%)         | 23 (51%)          |
| HD         | 3 (3%)           | 5 (11%)           |
| Treatment  |                  |                   |
| Medication | 29 (25%)         | 17 (38%)          |
| PTA        | 70 (62%)         | 10 (22%)          |
| Operation  | 15 (13%)         | 18 (40%)          |
| Amputation | 0 (0%)           | 6 (13%)           |

CAD: coronary artery disease, DM: diabetes mellitus, HD: hemodialysis, PTA: percutaneous transluminal angioplasty

**Table 4** The trend of the patient with critical peripheral artery disease (Fontaine III or IV) in our hospital (Jan. 2002 ~ Sep. 2003)

|            | ASO (n = 45) | TAO (n = 7) |
|------------|--------------|-------------|
| age (y/o)  | 71.2         | 58.4        |
| CAD        | 19 (42%)     | 1 (14%)     |
| DM         | 23 (51%)     | 0 (0%)      |
| HD         | 5 (11%)      | 0 (0%)      |
| Treatment  |              |             |
| Medication | 17 (38%)     | 3 (43%)     |
| PTA        | 10 (22%)     | 0 (0%)      |
| Operation  | 18 (40%)     | 0 (0%)      |
| Amputation | 6 (13%)      | 0 (0%)      |

ASO: arteriosclerosis obliterans, TAO: thromboangiitis obliterans, CAD: coronary artery disease, DM: diabetes mellitus, HD: hemodialysis, PTA: percutaneous transluminal angioplasty

め、骨髄細胞移植治療の多くは、ASO症例に対して施行されている。しかしながら、ASO患者は冠動脈疾患や脳血管疾患の合併が多く、全身麻酔下で大量の骨髄液を採取する骨髄細胞移植治療の侵襲性のため、骨髄細胞移植治療が困難な症例が少なくない (Table 5)。よって、ASO症例に対する骨髄細胞移植治療の適応は慎重に考慮すべきであり、より侵襲の少ない末梢血幹細胞移植<sup>5)</sup>、遺伝子治療、サイトカイン治療に期待される。

当院では骨髄細胞移植治療の対象にASOを含めていたが、実際に施行可能であったのは、今回提示したバージャー病の3例であった。高度の虚血性潰瘍が全例において、骨髄細胞移植治療により、皮膚潰瘍の改善が認められた。一般に、広範囲の潰瘍に対しては、骨髄細胞移植治療に加えて皮膚移植が併せて施行される場合が多いが、骨髄細胞移植単独で改善することができた。このことは、バージャー病の病態として中枢側の動脈は比較的正常であるため細胞移植をうける下腿の血流の改善のみで、ASO症例より治療効果が高くなると考えられた。また、バージャー病はASOに比し若年で、心血管や脳血管の合併症が少なく、侵襲性の高い骨髄細胞移植治療も比較的容易に施行することができた。

また、虚血性潰瘍に対する細胞移植の治療効果は、TACTの報告でも治療効果は60%と報告されている<sup>3,4)</sup>。TACTでは骨髄細胞と末梢血幹細胞移植の前向き研究

**Table 5** Results of progress in consideration to bone marrow transplantation in our hospital (Jan. 2002 ~ Sep. 2003)

| ASO        | n = 15   |
|------------|----------|
| BM-MNCs    | 0 (0%)   |
| CAD        | 11 (73%) |
| Malignancy | 3 (20%)  |
| Infection  | 1 (7%)   |
| TAO        | n = 6    |
| BM-MNCs    | 4 (66%)  |
| Malignancy | 1 (16%)  |
| Reject     | 1 (16%)  |

BM MNCs: bone marrow mononuclear cells, ASO: arteriosclerosis obliterans, TAO: thromboangiitis obliterans

をしているが、正確に治療効果を判定するには二重盲比較試験が必要である。しかし、骨髄細胞を採取するので、プラセボを投与することは倫理的に困難であり、現段階では他治療と比較して判断している。よって、当院では最低1カ月内科的治療を施行してから、安静時疼痛や皮膚潰瘍が治癒しない症例のみを対象としている。

## 結 論

今回の検討では症例が3例と少数であるが、バージャー病の難治性皮膚潰瘍に対しての骨髄細胞移植治療は、良好な治療効果が期待できると考えられた。

本治療の問題点として、ABPIや血管造影などの一般検査では、皮膚潰瘍の改善にもかかわらず、有意な変化は見られなかった。一般検査所見と臨床症状との間に乖離が認められた理由として、血管再生治療で再生される血管は微小血管と推測され、一般の血管造影では描出できないためと考えられた。今後、微小血管造影法<sup>6)</sup>など、血管再生治療を適切に評価する方法の確立が望まれる。

## 文 献

- 1) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science, 1997, 275: 964-966.
- 2) Shintani S, Murohara T, Ikeda H et al: Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. Circulation, 2001, 103: 897-903.
- 3) Inaba S, Egashira K, Komori K: Peripheral-blood or bone-

- marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis? Lancet, 2002, **360**: 2083.
- 4 )Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T et al: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. Lancet, 2002, **360**: 427–435.
- 5 )Iba O, Matsubara H, Nozawa Y et al: Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs. Circulation, 2002, **106**: 2019–2025.
- 6 )Mori H, Hyodo K, Tobita K et al: Visualization of penetrating transmural arteries in situ by monochromatic synchrotron radiation. Circulation, 1994, **89**: 863–871.

## Effects of Therapeutic Angiogenesis Using Autologous Bone Marrow Mononuclear Cell Implantation to the Incurable Skin Ulcer with Buerger's Disease

Masaaki Chiku, Kazuhiro Nishigami, Tokio Hayashi, Hitoshi Ogino,<sup>\*1</sup> Hitoshi Matsuda,<sup>\*1</sup> Kenji Minatoya,<sup>\*1</sup> Hiroaki Sasaki,<sup>\*1</sup> Takeshi Nakatani,<sup>\*1</sup> Akihiko Taguchi,<sup>\*2</sup> Shigeki Miyata,<sup>\*3</sup> Masataka Kamei,<sup>\*4</sup> Ryouichi Tanaka,<sup>\*5</sup> Hidezo Mori,<sup>\*6</sup> Kunio Miyatake, and Hitonobu Tomoike

Division of Cardiovascular Medicine, National Cardiovascular Center

<sup>\*1</sup>Division of Cardiovascular Surgery, National Cardiovascular Center

<sup>\*2</sup>Division of Cerebrovascular Medicine, National Cardiovascular Center

<sup>\*3</sup>Division of Transfusion Medicine, National Cardiovascular Center

<sup>\*4</sup>Division of Anesthesia, National Cardiovascular Center

<sup>\*5</sup>Division of Radiology, National Cardiovascular Center

<sup>\*6</sup>Division of Cardiac Physiology, National Cardiovascular Center

**Key words:** Autologous bone marrow mononuclear cell implantation, Therapeutic angiogenesis, Buerger's disease

The therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow mononuclear cell implantation has been implemented for cases with critical peripheral artery disease (PAD), for which conventional treatments proved ineffective. The results of those studies showed that the improvements of intermittent claudication or rest pain were significant, but ischemic skin ulcer in those patients failed to be cured fully. We treated three cases with ischemic skin ulcers by Buerger's disease using bone marrow mononuclear cell implantation. Consequently, skin ulcers in three patients improved completely. The present study suggested that the therapeutic angiogenesis using bone marrow mononuclear cell implantation was a good solution to Buerger's disease, still with skin ulcers. (J. Jpn. Coll. Angiol., 2004, **44**: 191–197)