

## 1. 末梢動脈

# 自己骨髄単核球移植による重症虚血肢の治療： 治療効果に対する影響因子についての検討

勝田 洋輔<sup>1</sup> 有馬 健<sup>2</sup> 斎藤 裕<sup>2</sup> 外山 康之<sup>2</sup> 香月与志夫<sup>2</sup>  
佐々木健一郎<sup>2</sup> 今泉 勉<sup>2</sup>

**要 旨：**われわれは、自己骨髄単核球移植が重症虚血肢の有効な治療法の一つであることを報告してきた。しかし、症例によりその有効性に差があることが明らかになってきた。本稿では、自己骨髄単核球移植が有効であった症例と無効であった症例を提示する。さらに、当施設において本治療法を施行した症例について解析し、その治療効果に影響を与える因子を解析する。

( J Jpn Coll Angiol, 2007, 47: 221-225 )

Key words: bone-marrow mononuclear cell, critical limb ischemia

## 背 景

浅原らが、成人末梢血中単核球分画に血管内皮細胞に分化しうる内皮前駆細胞が存在することを報告<sup>1)</sup>して以来、これらの細胞を虚血部位に移植することで血管新生が誘導されることが明らかにされ、細胞移植による血管新生療法が考案された。

その後、内皮前駆細胞を多く含む骨髄単核球分画を虚血部位に移植しても同等の効果が得られることが明らかになった。これを基に、当施設を含む国内3施設で、閉塞性動脈硬化症や血栓性動脈閉塞症(パージャー病)患者による重症虚血肢に対する自己骨髄単核球移植治療(以下、自己骨髄単核球移植)の臨床研究を行った。45例に対して自己骨髄単核球移植を行い、その結果、有効性と安全性が証明された<sup>2)</sup>。以来、自己骨髄単核球移植は現在本邦で広く行われている。しかしながら、自己骨髄単核球移植を行った症例のなかには救肢できず、移植後に四肢切断を行わざるを得ない症例も存在する。そこで、本稿では、当施設での自己骨髄単核球移植の自験例を示し、自覚症状、他覚所見、それぞれの臨床指標にどのような因子が影響するかについて検討する。

## 対 象

閉塞性動脈硬化症もしくはパージャー病で、Fontaine分類IIb～IV度、既存の内科的・外科的治療が無効な患者を対象とした。血管新生が増強することで不利益を被る可能性がある疾患を有する患者(悪性疾患を有するか5年以内に既往がある患者、慢性関節リウマチの患者、無治療の糖尿病性網膜症もしくは虚血性心疾患がある患者)、妊娠中の患者、合併症により余命が1年以内の患者、薬物やアルコール依存がある患者、精神疾患や痴呆により本併用療法の理解が不能な患者は適応から除外した。

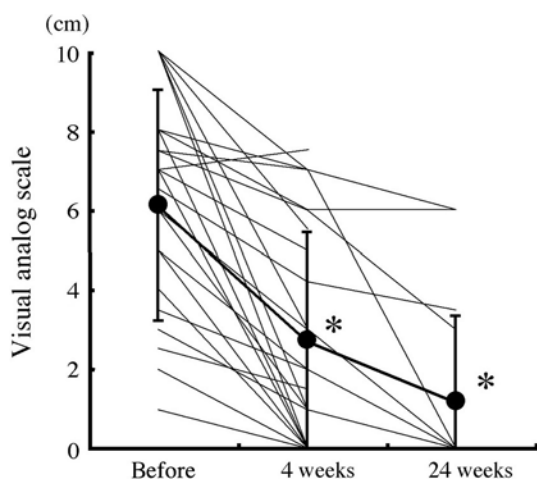
## 方 法

評価項目：以下の項目を治療1週間前および治療後4週後、24週後に評価した。i)自覚症状および身体所見：自覚症状を定量化したvisual analog scale(VAS)。潰瘍を形成している患者では、潰瘍の大きさを長径×短径で記録し、その積を定量的な解析に使用した。ii)歩行距離：歩行可能な患者に関しては、無痛性歩行距離を測定。iii)ankle-brachial pressure index(ABI)：上下肢の血圧を記録。iv)経皮的皮膚酸素分圧(transcuta-

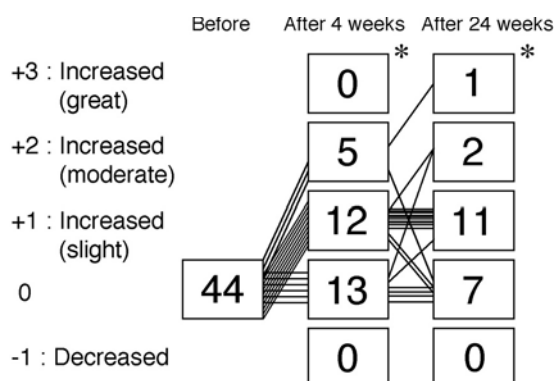
<sup>1</sup>久留米大学循環器病研究所

<sup>2</sup>久留米大学医学部内科学講座心臓・血管内科部門

2007年4月6日受理



**Figure 1** Time course of visual analogue scale (VAS). VAS was significantly improved after transplantation of bone-marrow mononuclear cells (BM-MNCs). Subjective pain evaluated by VAS was completely abolished in 65% of treated patients. \*:  $p < 0.01$  vs before



**Figure 2** Time course of digital subtraction angiographic score (DSA score). DSA score was significantly improved after transplantation of BM-MNCs. \*:  $p < 0.05$  vs before

### 当施設における自己骨髄単核球移植症例

neous oxygen pressure:  $TcO_2$  ) v 血管造影 digital subtraction angiography: DSA )による側副血行路, 新生血管の評価( DSA score ): DSAの画像は撮影条件を厳密に一致させたうえで本研究には無関係の放射線科医師が二重盲検法で評価した。DSA scoreは, 血管造影上の血管陰影が減少から著名増加まで5段階に分けて評価した。

術前準備: 適応除外項目に抵触しないことを血管造影および諸検査にて確認。治療前1週間前に自己末梢血を貯血する( 400ml )。骨髄液採取および骨髄単核球細胞の分離: 全身麻酔もしくは腰椎麻酔下に患者腸骨より600~800mlの骨髄液を採取し, 比重遠心分離法( CS3000, Baxter社製 )にて骨髄単核球を分離。この際, 先に貯血した自己血を輸血する。虚血部位への骨髄単核球投与: 分離した骨髄単核球を, 3cm間隔で格子状にマークした部位に40~60カ所に分けて23G針を用いて虚血部位に筋肉内投与をする。

### 統計解析

統計ソフトはSPSS for Windows ver 10.07Jを用いた。数値は平均値 ± 標準偏差にて表記した。連続変数の群間比較には,  $t$ -検定を用いた。単変量解析には, 重回帰分析を用い, 多変量解析には, 目的変数が連続変数の場合は重回帰分析を, 目的変数が非連続変数の場合には, ロジスティック回帰分析を用いた。

当施設では, 2000年11月から2007年2月までの間に, 44例51肢に対して自己骨髄単核球移植を行った。分離し, 移植を行った骨髄単核球は平均 $3.6 \times 10^6$ 個( CD 34陽性細胞数:  $5.1 \times 10^7$ 個 )であった。44例中2例が患肢の大切断, 3例が小切断を繰り返し脱落した。上記以外の39例中26例30肢で慢性期の評価を終了した。慢性期まで評価可能であった26例中17例は自覚症状の完全な消失を得た( 完全緩解率: 65% )。軽度改善を含めると, 患肢切断例を除く全例で自覚症状は改善した(  $p < 0.01$ , Fig. 1 )。潰瘍が存在し6カ月後に観察し得た症例の23例中13例で潰瘍は消失した( 潰瘍消失率: 57% )。また, ABI, 無痛性歩行距離, DSA scoreも有意に改善した(  $p < 0.05$  )。血流評価項目も改善傾向を示した。血管造影を定量的に示したDSA scoreは4週間後に有意に改善した(  $p < 0.05$  )が, 24週後には治療前と同等になる症例がみられた( Fig. 2 )。

### 症例提示

以上のように, 自己骨髄単核球移植の結果, 著明な自覚症状の改善, 潰瘍の縮小効果が確認された。しかし, 症例により, その治療効果には解離がみられる。以下に本治療が奏功した症例と無効であった症例の典型例を提示する。

症例1は, 32歳男性のバージャー病患者。数年以上

Case 1



Case 2



A

B

**Figure 3** Time course of ischemic ulcer.

A (case 1; Buerger's disease): A 32-year-old man presented with huge refractory ischemic ulcer along with severe rest pain. After transplantation of BM-MNCs, ulcer and subjective pain improved slowly, and disappeared completely 6 months after treatment.

B (case 2; Buerger's disease): A 67-year-old man presented with huge refractory ischemic ulcer along with severe rest pain. Despite transplantation of BM-MNCs, ulcer grows rapidly and he had his leg amputated below knee 2 weeks after transplantation.

経過した足背部の巨大潰瘍を呈し、強い安静時疼痛を自覚していた。自己骨髄単核球移植(単核球細胞数  $3.80 \times 10^9$  個)後、自覚症状、潰瘍ともに軽快した。6カ月後には、自覚症状、潰瘍ともに消失し、DSA score、 $TcO_2$  ともに改善した。本治療著効例と考えられる(Fig. 3A)。

症例2は67歳男性のバージャー病患者。急激に増悪してきた黒色変化を伴う巨大潰瘍を呈し、強い安静時疼痛を自覚していた。自己骨髄単核球移植(単核球細胞数  $1.87 \times 10^9$  個)後も潰瘍の増悪は進行し、術後2週目に下腿で切斷となった。本治療無効例と考えられる(Fig. 3B)。

### 自己骨髄単核球移植の治療効果に影響を与える因子

最近、動脈硬化危険因子の数が多ければ多いほど、本治療法で用いている内皮前駆細胞の数や機能が低下することが報告された<sup>3)</sup>。さらに、高脂血症<sup>4)</sup>、糖尿病<sup>5)</sup>、加齢<sup>6)</sup>、喫煙<sup>7)</sup>のそれぞれが、内皮前駆細胞の数や機能を抑制することが明らかにされ、その結果それ

らの危険因子を合併する症例においては、自己骨髄単核球移植による血管新生効果を減弱させる一因となっている可能性が高いと考えられている。

このため、当施設で自己骨髄単核球移植を行った症例(切斷例を除外)における、治療効果(従属因子)に影響を与える因子(独立因子)について検討を行った。治療効果は、自覚症状:VAS、歩行距離、潰瘍面積、血流評価項目(DSA score、 $TcO_2$ )について、それぞれ1カ月後および6カ月後の検討を行った。独立因子として、年齢、性別、基礎疾患(バージャー病の有無、糖尿病、透析、高脂血症)、移植細胞数、術前重症度(Fontaine重症度分類、術前ABI)、術後血流改善の有無(ABI、DSA score、 $TcO_2$ の改善の有無)について検討した。

年齢、性別で補正後の多変量解析の結果を示す(Table 1)。1カ月後のDSAによる血流改善はバージャー病症例や、術前ABIが低い症例ほど良好であった。また $TcO_2$ の改善は糖尿病で不良であった。6カ月後の歩行距離の改善は透析症例で不良であり、DSA

Table 1 Determinants of clinical outcome by multivariate analysis

Dependent variables			Independent variables	$\beta$	p
After 1 month	Symptom	VAS	ABI before treatment	0.372	0.056
	Walking distance		Improvement of TcO <sub>2</sub>	0.446	0.224
	Ulcer		-	-	-
	Blood flow	DSA score	Buerger's disease	0.655	0.007
			ABI before treatment	-0.514	0.018
			TcO <sub>2</sub>	-0.627	0.024
After 6 months	Symptom	VAS	-	-	-
	Walking distance		Hemodialysis	-0.771	0.003
	Ulcer		-	-	-
	Blood flow	DSA score	Number of CD34+ cells	0.744	0.015
			TcO <sub>2</sub>	-	-

Multiple linear regression analysis adjusted for age and sex

による血流改善は移植細胞数が多いほど良好であった。自覚症状および潰瘍に影響を与える因子は明らかかなものはなかった。

以上より、基礎疾患として透析、糖尿病が存在すると自己骨髄単核球移植の治療効果が減じること、およびパージャー病は同治療効果が良好であることが統計学的にも示された。また、移植細胞数が血流改善に影響を与えることも統計学的に示された。

さらに、われわれは、喫煙患者における内皮前駆細胞の数・機能の低下に酸化ストレスの増大が関与している可能性を報告している<sup>8)</sup>。このため、動脈硬化危険因子を持つ症例に対しては、薬物治療(スタチン・葉酸)や禁煙等による危険因子の治療<sup>6,7,9)</sup>に加え、抗酸化剤の投与が、内皮前駆細胞の数・機能や血管新生能を改善するものとして期待される。

### 自己骨髄単核球移植の合併症

本治療の留意点として、動脈硬化症のプラーク形成を促進する潜在的可能性も挙げられる。実際、ステント留置後の急性心筋梗塞患者の冠動脈内に末梢血幹細胞を投与すると再狭窄(内皮細胞増殖)が促進したこと<sup>10)</sup>、本治療後に心筋梗塞のリスクが増大する可能性が示唆されることが報告されている。本治療の適応となる患者群は、元来動脈硬化が強い症例が多いと考えられることから、脳・心筋虚血を含めた十分に注意深い経過観察が必要である。また、本治療は本質的に新生血管の発達を促すことを目的とするため、新生血管

が発達すると有害な病態(悪性疾患、糖尿病性増殖性網膜症、慢性関節リウマチ等)では禁忌となるべきであろう。また、移植する細胞は間葉系細胞を含んだ多種類のものになるため、血管腫や骨形成等が生じる可能性は否定できないことから、経時的な注意深い経過観察が必要である。

### 終わりに

自己骨髄単核球移植は、本邦において末梢動脈閉塞性疾患に対する補助的治療法として急速に認知されつつある。本稿では、自験例を中心に本治療法の治療効果に影響を与える因子について検討を加えた。今後も、さまざまな因子について検討を加え、本治療が適する対象疾患の的確な選別やより有効な併用療法の選択を行う必要がある。

### 文 献

- 1) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, **275**: 964-967.
- 2) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T et al: 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.
- 3) Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A et al: Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery

- disease. *Circ Res*, 2001, **89**: E1–E7
- 4 )Chen JZ, Zhang FR, Tao OM et al: Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)*, 2004, **107**: 273–280.
- 5 )Tepper OM, Galiano RD, Capla JM et al: Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*, 2002, **106**: 2781–2786.
- 6 )Shimada T, Takeshita Y, Murohara T et al: Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in the precocious-aging klothe mouse. *Circulation*, 2004, **110**: 1148–1155.
- 7 )Kondo T, Hayashi M, Takeshita K et al: Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24**: 1442–1447.
- 8 )Takeshita Y, Katsuda Y, Sasaki K et al: Chronic efficacy of therapeutic angiogenesis by transplantation of autologous bone marrow cells for Buerger's disease. *Circulation*, 2003, **108** (suppl IV): 562.
- 9 )Sasaki K, Duan J, Murohara T et al: Rescue of hypercholesterolemia-related impairment of angiogenesis by oral folate supplementation. *J Am Coll Cardiol*, 2003, **42**: 364–372.
- 10 )Kang HJ, Kim HS, Zhang SY et al: Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet*, 2004, **363**: 751–756.

## **Autologous Transplantation of Bone-marrow Mononuclear Cells for Critical Limb Ischemia: Parameters for Therapeutic Effect**

Yousuke Katsuda,<sup>1</sup> Ken Arima,<sup>2</sup> Yutaka Saito,<sup>2</sup> Yasuyuki Toyama,<sup>2</sup> Yoshio Katsuki,<sup>2</sup>  
Ken-ichiro Sasaki<sup>2</sup> and Tsutomu Imaizumi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Cardiovascular Research Institute, Kurume University, Fukuoka, Japan

<sup>2</sup>Division of Cardio-Vascular Medicine, Department of Internal Medicine, Kurume University School of Medicine, Fukuoka, Japan

**Key words:** bone-marrow mononuclear cell, critical limb ischemia

We had previously reported that autologous transplantation of bone-marrow mononuclear cell (cell therapy) was useful in treating critical limb ischemia. However, further studies revealed that response to cell therapy varied patient to patient. We present responders and non-responders to cell therapy. Furthermore, we analyzed the outcomes of this therapy to determine and clarify the parameters of cell therapy's therapeutic effects.

(*J Jpn Coll Angiol*, 2007, **47**: 221–225)