

末梢血幹細胞による血管再生治療

堀江 卓 川村 明夫 津田 一郎 米川 元樹

要 旨：当院では、四肢末梢血管障害の患者に末梢血幹細胞を局注して末梢血管の再生を図ってきた。CD34陽性細胞の純化はしなかった。現在までに135例(93例は血液透析患者)に行った。重篤な副作用はなかった。CD34陽性細胞は平均 3.4×10^7 個採取され、135例中41例は潰瘍、チアノーゼが改善し、その効果は最長62カ月持続した。壊疽が指趾を越えるなど、症状が進行性に増悪する症例の成績は不良だった。(J Jpn Coll Angiol, 2008, 48: 425-429)

Key words: therapeutic angiogenesis, PBSCC, CD34(+) cells, PAD, hemodialysis

緒 言

当院では、閉塞性動脈硬化症(ASO)、パージャーマ病、糖尿病性血管障害および膠原病(SLE, MCTD等)といった四肢末梢血管障害の患者を対象に、末梢血幹細胞を局所注射して末梢血管の再生を図っている。末梢血幹細胞移植とは、G-CSF(顆粒球コロニー刺激因子)の投与により血中に造血幹細胞を放出させ、それをを用いて骨髄移植の代わりとする治療で、血液内科で行われてきた。造血幹細胞の表面にはCD34という抗原が発現している。1997年頃よりCD34陽性細胞の分画中に、血管内皮前駆細胞が存在し、これは骨髄に由来し、虚血肢における血管新生に関与することが、実験的に明らかになった¹⁻⁴⁾。そこで、CD34陽性細胞移植による血管再生療法が、まず骨髄単核球を採取筋注することで行われた⁴⁻⁶⁾。経過は良好で最長14カ月下肢の血流増加は保たれた。しかし、骨髄採取には全身麻酔や自己血輸血が必要で患者への負担が大きいことから、CD34陽性細胞を先の血液内科と同じ方法で末梢血から採取する方法(peripheral blood stem cell collection: PBSCC)⁷⁾を行った。さらに、採取液からCD34陽性細胞のみを純化^{8,9)}しようとする1回に数十万円ほどの試薬が必要となる。採取液中には赤血球、単核球および血小板が混在しているが、 1×10^7 個以上のCD34陽性細胞が含まれていれば、採

取液をそのまま筋注することにした^{10,11)}。

対象と方法

四肢末梢血管血行障害の患者を対象とした。重篤な虚血性心疾患と脳血管障害のないことを、心エコー、心筋シンチ、脳CT等で確認した。次いで、G-CSF 5 μ g/kg/dayを4日間毎日皮下注した。4日目にPBSCCを血液成分分離装置を用いて行った。採取されたCD34陽性細胞数をフローサイトメトリー(FACScanTM, Becton Dickinson社)で計測した。同日中に採取液を患肢に1カ所0.5~1.0mlずつ23G針を用いて筋注した。麻酔は、上肢は全身麻酔、下肢は腰麻によった。治療効果の判定には、自覚症状、プレチスモグラフ、サーモグラフ、ABI(足関節/上腕血圧比)、3D-CTおよび血流シンチによった。

なお、臨床研究対象者に対する人権擁護上の配慮として、平成13年12月27日に札幌北楡病院医学倫理委員会による審査を受けた。G-CSFの副作用で心筋梗塞や脳血管障害を起こした報告^{7,12)}がある。したがって、重篤な虚血性心疾患や脳血管障害がないことを確認すべきであるとされた。

結 果

現在までに135例に行った。年齢は25~86歳(平均65.5歳)。男96例、女39例で、血液透析中の患者が93例

Table 1 Results of this study (1)

	HD(+) DM(+)	HD(+) DM(-)	HD(-) DM(+)	HD(-)DM(-)	Total
N	66	27	23	19	135
No amputation (%)	29 (43.9)	17 (63.0)	16 (69.6)	18 (94.7)	80
Minor amputation (%)	10 (15.2)	3 (11.1)	1 (4.3)	0 (0)	14
Major amputation (%)	28 (40.9)	7 (25.9)	6 (26.1)	1 (5.3)	41

Table 2 Results of this study (2)

Fontaine	IV Necrosis(+) Major	IV Necrosis(+) Minor	IV Necrosis(-) Ulcer(+)	III	II	I	Total
N	21	27	33	23	22	9	135
No amputation (%)	7 (33.3)	7 (25.9)	17 (51.5)	21	20	8	80
Minor amputation (%)	1 (4.8)	6 (22.2)	4 (12.1)	1	1	1	14
Major amputation (%)	13 (61.9)	14 (51.9)	12 (36.4)	1	1	0	41

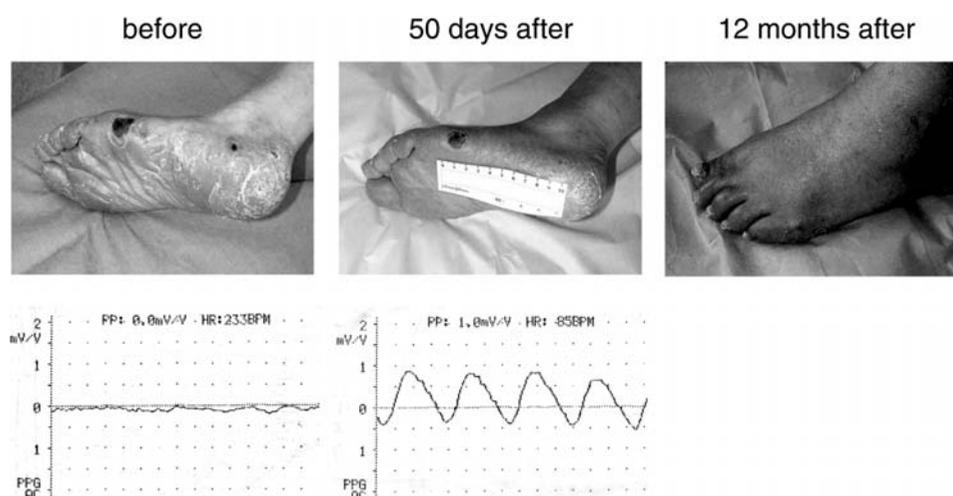


Figure 1 Case 1: 68 y.o, female, ASO, HD(+)DM(+).

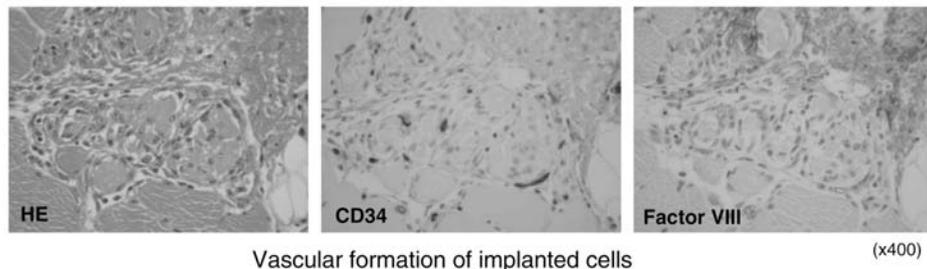
(68.9%)を占めた。平均透析歴は7.7年だった。一方、糖尿病合併例は89例で、血液透析例93例中66例(71%)が糖尿病だった。足に治療したのが125例、手が11例(手足2例)で、Fontaine I度(冷感、しびれ)が9例、II度22例、III度23例、IV度が81例あった。移植したCD34陽性細胞数は平均 3.4×10^7 個で、改善が41例(観察期間が1~62カ月)、変化なし39例(1~53カ月)、切断が55例(0.3~31カ月)あった。切断は50例がFontaine IV度で34例は壊疽を伴っていた。小切断は14例であった。全症例を通しての救肢率は59.3%だった。治療後1カ月での自覚症状と

サーモグラムの改善のパターンが似ていた。

透析、糖尿病と治療成績(**Table 1**)をみると、HD(+)DM(+), HD(+)DM(-), HD(-)DM(+), およびHD(-)DM(-)の順に症例数も切断率も高かった。大切断では、HD(+)DM(+)が40.9%, HD(-)DM(-)は5.3%だった。

Fontaine分類、壊疽の範囲と治療成績(**Table 2**)では、症例数はFontaine IVで、壊疽のない例が33例と最も多く、切断率は大小あわせて48.5%だった。大切断率で見ると、指趾を越える壊疽、指趾に限局する壊疽、壊疽のない潰瘍、Fontaine III度の順で高かった。

1) Histology of amputated leg (one month after)



2)



Figure 2 Case 76: 59 y.o. male, ASO, HD(+), DM(-).

症例を示す。症例 1 は68歳女性(Fig. 1)。ASO, CRF (HD中), DMあり。主訴は両足潰瘍。1992年12月より血液透析を導入。1998年11月, ASOの診断でPGE1製剤処方されるも効なく, 2001年12月, 細胞治療を行った。G-CSFを4日間投与すると白血球数は40,000台まで上昇した。4日目にCS-3000でPBSCCを行った。処理量は10Lで約3時間を要し, 57mlの採取液を得た。その中の単核球数は 20×10^9 個で, CD34陽性細胞数は 4.0×10^7 個あった。そこで, 同日中に手術室で両足腓腹筋内にあわせて79カ所筋注した。白血球数は術後2~3日で正常化した。50日後には潰瘍は縮小し, プレチスモグラフ上脈波が出現した。12カ月後には潰瘍は消失した。

症例76は細胞治療後1カ月で切断となった。切断肢腓腹筋の観察では, CD34陽性細胞の集積, Factor VIII陽性の毛細血管の増生あり, 細胞治療の効果とされた(Fig. 2)。切断後の血管造影では足関節付近の前・後脛骨動脈の途絶があり, 病理学的に著明な石灰化と血栓を認めた。

症例79~82は血中VEGF濃度を測定した。治療により上昇し, 1カ月は持続した(Fig. 3)。

5年救肢率は透析患者で36.6%, 非透析患者で77.0%, 5年生存率は透析患者で17.5%, 非透析患者で69.6%だった。また非切断患者の5年生存率は46.6%,

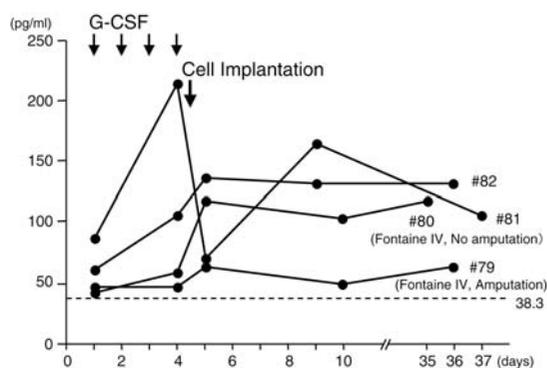


Figure 3 VEGF.

切断患者で12.4%だった(Fig. 4)。

考 察

Isnerら¹⁾, Asaharaら²⁾, Shintaniら³⁾, 室原ら⁴⁾は, 1997年頃よりCD34陽性細胞の分画中に血管内皮前駆細胞が存在し, これは骨髄に由来し, 虚血肢における血管新生に関与することを実験的に明らかにした。さらに細胞移植による血管再生療法の臨床応用も2000年より室原ら⁴⁾, 松原ら⁵⁾およびTateishi-Yuyamaら⁶⁾により開始され

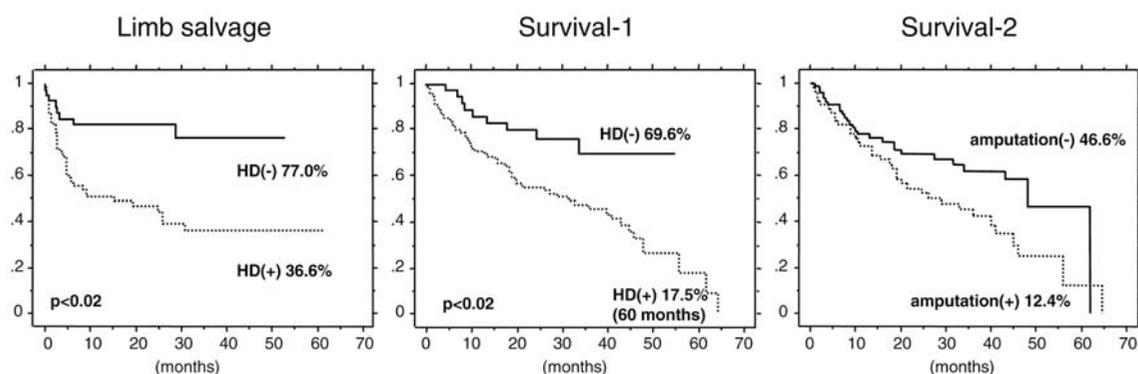


Figure 4 Cumulative limb salvage and survival curve.

た。CD34陽性細胞は末梢血より骨髄に豊富に存在することから、全麻下に自己骨髄液を500~600ml採取し、比重遠心分離法(CS-3000)にて骨髄単核球を分離した。約 1×10^9 個を虚血肢に筋注した。経過良好で最長14カ月⁵⁾下肢の血流増加は保たれた。また、稲葉ら^{8,9)}は、2001年頃よりCD34陽性細胞を骨髄からではなく末梢血よりPBSCCにて採取し、さらに免疫磁気ビーズ法を用いて純化して患肢に筋注した。細胞数は $1 \sim 4 \times 10^7$ 個で術後経過良好であった。症状の改善には 1×10^7 個で十分とされた。

一方、高倉¹³⁾は、血管新生のメカニズムは内皮前駆細胞ばかりでなく骨髄や末梢血中の血液細胞そのものが内皮細胞に成長因子を供給して血管新生を促すとした。また、Asahara²⁾は、実験的にCD34陽性細胞と陰性細胞とを一緒に培養することでCD34陽性細胞の血管内皮細胞への分化が促進されるとした。

今回、稲葉ら^{8,9)}の方法に準じてCD34陽性細胞を末梢血より採取したが、純化は行わなかった。 1×10^7 個以上採取されていれば他の血液細胞が混入していても問題はなく、また血管再生に有効と考えた^{10,11)}。

治療後1カ月での臨床成績で、自覚症状の改善とサーモグラフでの改善のパターンが一致していることより、自覚症状の改善は温度の上昇によるものとした。切断肢の組織所見で、移植した細胞による毛細血管の新生を認めた。毛細血管が増えることで、血流が増加した。また、VEGFの血中濃度上昇も血管新生を促したと考えた。この2点は、メカニズムを説明している。

適応について室原ら⁴⁾は、ASO、バージャー病で他の治療に反応しない40~75歳の患者で、除外項目として悪性

新生物、重症の糖尿病性網膜症、虚血性心疾患とした。

重篤な虚血性心疾患と脳血管障害のみを除外項目としたところ、切断例が135例中55例発生した。切断の危険因子は、血液透析、糖尿病、Fontaine IV度および壊疽の合併である。透析と糖尿病の合併例は135例中66例(48.9%)と最も多いが、大切断率も40.9%と最も高い。一方、SLEのように、両者の合併のない症例の成績は良好だった。動脈硬化による末梢血管の石灰化と、血管炎との違いかもしれない。

壊疽の範囲に注目すると、指趾を越えた場合(major necrosis)21例中13例(61.9%)が大切断となり、細胞治療による救肢は困難である。一方指趾に限局していたり(minor necrosis)、壊疽がない場合は、効果が期待できる。さらにFontaine III度以下では、まず大切断になることはないと考えられる。

したがって、糖尿病や透析を合併し、動脈硬化がベースにある場合は、壊疽が指趾を越えないうちに行った方がよい。最近、壊疽が趾に限局していても、受診前より病態が進行性に増悪してきた症例に行い、1カ月以内に大切断となった。病態進行例は注意を要する。血液透析患者では、Fontaine分類の比較的軽い例や、症状の安定している例に細胞治療を行うべきである。透析患者は救肢率、生存率ともに非透析例に比べて不良だった。また、非切断例は切断例に比べて長期生命予後が期待できた。

文 献

- 1) Isner JM, Asahara T: Angiogenesis and vasculogenesis as

- therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest*, 1999, **103**: 1231–1236.
- 2) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, **275**: 964–967.
 - 3) Shintani S, Murohara T, Ikeda H et al: Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation*, 2001, **103**: 897–903.
 - 4) 室原豊明, 新谷 理, 明石英俊 他: 細胞移植による血管新生療法. *実験医学*, 2001, **19**: 847–853.
 - 5) 松原弘明, 正木浩哉, 湯山恵里子 他: 閉塞性動脈硬化症への血管内皮幹細胞移植による血管再生治療. *呼と循*, 2002, **50**: 349–355.
 - 6) 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.
 - 7) 関口定美, 池淵研二: 末梢血幹細胞採取. *アフエレスマニユアル*, 日本アフエレス学会編, 秀潤社, 東京, 1999, 105–110.
 - 8) 稲葉頌一, 古森公浩, 江頭健輔: 末梢血幹細胞を利用した血管内皮前駆細胞治療の経験. *日本アフエレス学会雑誌*, 2002, **21**: 93.
 - 9) Inaba S, Egashira K, Komori K: Peripheral-blood or bone-marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis? *Lancet*, 2002, **360**: 2083.
 - 10) Kawamura A, Horie T, Tsuda I et al: Prevention of limb in patients with limbs ulcers by autologous peripheral blood mononuclear cell implantation. *Ther Apher Dial*, 2005, **9**: 59–63.
 - 11) Kawamura A, Horie T, Tsuda I et al: Clinical study of therapeutic angiogenesis by autologous peripheral blood stem cell (PBSC) transplantation in 92 patients with critically ischemic limbs. *J Artif Organs*, 2006, **9**: 226–233.
 - 12) 小寺良尚: 同種末梢血幹細胞移植におけるドナーの安全性. *血液フロンティア*, 2001, **11**: 1225–1232.
 - 13) 高倉伸幸: 血液細胞と血管新生. *最新医学*, 2001, **56**: 1722–1727.

Therapeutic Angiogenesis Using Peripheral Blood Stem Cells

Takashi Horie, Akio Kawamura, Ichiro Tsuda, and Motoki Yonekawa

Department of Surgery, Sapporo Hokuyū Hospital, Hokkaido, Japan

Key words: therapeutic angiogenesis, PBSC, CD34(+) cells, PAD, hemodialysis

Therapeutic angiogenesis using bone marrow cell transplantation has been reported, and this therapy was useful for arteriosclerosis obliterans (ASO). We attempted the same procedure using peripheral blood stem cell collection (PBSC). One hundred and thirty-five patients were included in this study, 93 of whom were hemodialysis patients. All were peripheral arterial disease (PAD) patients. The patients were given 5 µg/kg/day G-CSF for 4 days subcutaneously. PBSC was done on day 4. For each patient, 8.4 L peripheral blood was treated with an apheresis machine (CS-3000 or Spectra) and on average 3.4×10^7 CD34 cells were harvested with mononuclear cells. We did not purify the CD34 cells using the magnetic beads method, and the CD34 enriched fluid (56.7 ml) was injected at 113 points of limb muscle on the same day. Forty-one patients recovered. The disappearance of a foot ulcer continued for 5 years. The symptoms of another 39 patients did not change, but their limbs were rescued. Fifty-five patients underwent amputations because their ulcers were necrotic and infected. (*J Jpn Coll Angiol*, 2008, **48**: 425–429)