

自己骨髓单核球細胞移植の成績と適応について

岡崎 悅之¹ 勝田 洋輔³ 佐々木健一郎² 有馬 健² 斎藤 裕² 外山 康之²
 香月与志夫² 大塚 昌紀² 仲吉 孝晴² 大塚 裕之¹ 金谷 蔵人¹ 横倉 義典¹
 中村 英司¹ 廣松 伸一¹ 明石 英俊¹ 今泉 勉²

要 旨：当施設では 2000 年より ASO, TAO(Buerger 病)の虚血肢に対して自己骨髓单核球細胞移植を行ってきた。安静時疼痛や無痛性歩行距離の改善および潰瘍治癒において有効性を認め、救肢率および生存率でも比較的良好な結果であった。TACT study では虚血肢に対してある一定の治療効果が得られたと考えているが、その適応について明確にすべきである。また、細胞治療のメカニズムをさらに解明する必要がある。

(J Jpn Coll Angiol, 2011, 51: 441–446)

Key words: therapeutic angiogenesis, bone-marrow mononuclear cell, peripheral arterial disease

はじめに

久留米大学を含め 3 大学で、2000 年 1 月より閉塞性動脈硬化症(ASO)と Buerger 病(TAO)の末梢動脈閉塞症に対して血管新生療法が TACT(therapeutic angiogenesis by cell transplantation)study として開始され、その 3 年後には TACT study の早期成績が Lancet に報告されている¹⁾。この報告により自己骨髓单核球細胞移植の血流改善効果と安全性が明らかにされ、2003 年 6 月には高度先進医療として認可された。しかし Lancet に掲載された時点では、血管新生療法に用いる細胞の種類についてはすでに議論があった。骨髓单核球細胞以外に、G-CSF 勤員末梢血单核球(幹)細胞、G-CSF 勤員選別 CD34 陽性細胞、さらに末梢血单核球細胞²⁾でも治療効果があることが指摘されていた。血管内皮前駆細胞(EPC: endothelial progenitor cell)は分化段階にある未分化な細胞であり、その細胞を投与することで虚血組織において血管発生(vasculogenesis)型の血管再生がみられることが期待された。よって骨髓单核球細胞は EPC を多く含む分画(幹細胞)として移植された。一方で、移植細胞からパラクライン的に血管新生促進因子が放出されることによる血管新

生(angiogenesis)が主体であることが明らかにされた。また幹細胞を含まない末梢血单核球細胞を用いる方法では、单核球細胞移植は虚血肢の骨格筋細胞における血管増殖因子の産生を促す作用が報告された³⁾。

TACT study では、移植細胞が虚血組織でどのように生存し機能するのか、そのメカニズムは未だ不明な点が多いと思われる。また、糖尿病や加齢などの因子、動脈硬化疾患の存在が EPC の数や機能に関与しており、治療効果にも影響があることが明らかにされた。今回、当施設での早期および遠隔期の成績を ASO と TAO で比較したが、それぞれに自己骨髓单核球細胞移植の有用性を認めた。その結果と適応について考察を加えて著述する。

対象と方法

2000 年 1 月から ASO と TAO の Fontaine IIb 以上の虚血肢で、バイパス困難と判断された症例に自己骨髓单核球細胞移植を行った。治療効果の判定は細胞治療の 1 カ月、6 カ月後に行い、臨床症状の改善度の評価として、1)潰瘍径、2)安静時疼痛 VAS: visual analog scale、3)無痛性歩行距離 PFWD: pain-free walking distance、血流の評価として、4)ABI: ankle-brachial blood pressure index、5)LDBF: laser-Doppler blood flow、6)経皮的酸素

¹ 久留米大学医学部外科

² 久留米大学医学部心臓血管内科

³ 福岡市医師会成人病センター循環器内科

2011 年 9 月 12 日受理

Table 1 Baseline date for patients with critical ischemia

Target disorder (ASO/ TAO/ Other)	15 / 33 / 2
Fontaine classification (IIb/ III/ IV)	11 / 7 / 32
Age (yrs)	54.6±14.9
Gender (Male/ Female)	40 / 10
Hypertension (Yes/ No)	17 / 33
Dyslipidemia (Yes/ No)	11 / 39
Diabetes (Yes/ No)	17 / 33
Dialysis (Yes/ No)	6 / 44
Number of transplanted cell	3.25±3.00×10 ⁹
Number of transplanted CD34+ cell	4.94±3.64×10 ⁷

分圧 TcO_2 : transcutaneous oxygen pressure, 7)血管造影
DSA: digital subtraction angiography を行った。治療効果の統計学的解析は、1カ月後45例、6カ月後では26例で行った。遠隔期の結果として大切断回避率、生存率の検討を行った。

細胞移植は、約600~800 mlの骨髓液を採取後、比重遠心分離法にて骨髓単核球細胞を分離し、虚血部位へ筋注を行う。筋注は1箇所につき細胞液1 ml以下、約50箇所に細胞液を投与した。方法の詳細は以前の報告で示した^{4, 5)}。移植細胞液中のCD34陽性細胞数の測定を全例に行った。

結 果

2000年1月から2007年12月までに50例53肢に施行した。ASO 15例、TAO 33例で平均年齢は54.6歳、性別では男性40例、女性10例であった。糖尿病性腎不全による血液透析6例に施行した。患者背景を**Table 1**に示した。100 m以下の間歇性跛行例 IIb: 11例、Fontaine III: 7例、IV: 32例を行った。ASOではバイパスの適応となる場合が多いが、TAOの場合はむしろ血管新生療法を積極的に行った。細胞移植時すでに広範な壊死、骨髄炎を認めていた3肢は移植後1週間以内に大切断を行った。これらは細胞治療の効果に関係なく大切断の適応があったと判断し統計学的解析から除外した。それ以後、感染を伴う広範な潰瘍・壊死症例は血管新生療法の適応外とした。移植した細胞数に含まれるCD34陽性細胞数は 1×10^7 個以上を全例で確保されていた。

1)早期・中期成績(1カ月後、6カ月後)

全症例における、VASで評価した疼痛と無痛性歩行距離(PFWD)の自覚症状、およびABI、LDBF、 TcO_2 、

Table 2 Clinical outcome after BMMNC implantation

	Before	After 1 m	After 6 m
VAS (cm)	5.0±2.9*	2.3±2.3*	0.5±0.9*
PFWD (m)	90.0±80.6*	183.5±290.3*	411.1±174.6*
ABI	0.63±0.25	0.61±0.23	0.61±0.23
Ulcer			Healing ($\leq 6M$) 66.7% (18/27)
DSA		Improvement 44% (22/50)	

VAS、visual analog scale; PFWD、pain-free walking distance; ABI、ankle brachial pressure index; *P for trend <0.05, ANOVA

Table 3 Clinical outcome of symptoms and blood flow

(After 6 m)	Kurume University	11 hospitals (Am Heart J 2008)
Symptoms	p (vs Before)	p (vs Before) ASO / TAO
VAS	<0.001	0.0078 / 0.039
PFWD (m)	<0.05	<0.001 / <0.001
Ulcer	66.7% (<6 m)	<0.001 / <0.001
Blood flow		
ABI	N.S	0.075 / 0.54
TcO_2	N.S	0.19 / 0.27
LDBF	N.S	
DSA score (After 1 m)	< 0.05	

VAS、visual analog scale; PFWD、pain-free walking distance; ABI、ankle brachial pressure index; TcO_2 、transcutaneous pressure oxygen; LDBF、laser-Doppler blood flow; DSA、digital subtraction angiography

DSAの血流評価の結果を示した(**Table 2, 3**)。VASとPFWDの自覚症状は1カ月後、6カ月後まで経過とともに改善傾向を認め、治療前と比較し有意差をもってそれぞれの時点で改善していた。しかし、血流評価であるABI、LDBF、 TcO_2 は統計学的に有意な改善は認めなかった。DSAでは1カ月後に45肢中22肢(44%)で血管影の増加を認めた。6カ月後にその内の21肢にDSAが行われ、増加していた3肢で術前状態に戻っていたが、その他の増加例では治療効果が維持されていた。潰瘍症例での潰瘍治癒率は6カ月後で66.7%であった。潰瘍・壊死部の趾切断にて速やかに創治癒を得た症例は潰瘍治癒例とした。

ASOとTAOのそれぞれの疾患について、Fontaine分類別に6カ月後の結果を評価した(**Table 4**)。IIbはASO

Table 4 Improvements at 6 months after BMNCs injection

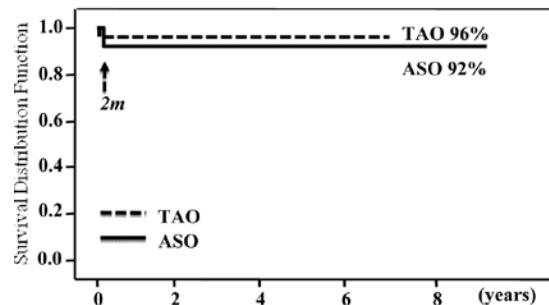
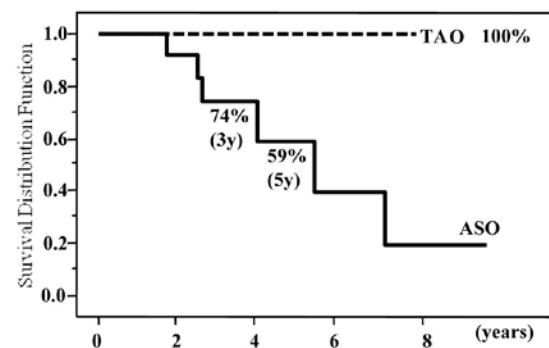
Fontaine classification	ASO	TAO	Total
Intermittent claudication (IIb)			
Improvement			
PFWD ≥100 m (ABI ≥2.0)	3/5 (60%) (1)	6/6 (100%) (3)	9/11 (81.8%) (4)
Rest pain (III)			
Improvement	3/4 (75%)	3/3 (100%)	6/7 (83.3%)
Ulcer (IV)			
Healing	5/8 (62.5%)	13/19 (68.4%)	18/27 (66.7%)

5例中3例、TAO 6例中全例で歩行距離の改善があり、9例の改善例中4例にABI≥2.0の改善を伴っていた。安静時疼痛ではASO 4例中3例、TAO 3例中全例で疼痛の改善があり、TAOでは歩行距離、疼痛については100%の改善率で、ASOより症状の改善する傾向にあった。潰瘍例で6カ月以内に潰瘍治癒を認めていたのは、ASO 8例中5例62.5%、TAO 19例中13例68.4%で同様であった。ASOの非治癒3例中2例は糖尿病性腎不全による血液透析例で、TAOの非治癒6例中3例は喫煙再開例であった。

2) 遠隔期成績(切断回避率、累積生存率)

遠隔期の結果を大切断回避率で評価した。大切断を回避された3年後の救肢率は、ASO 92%、TAO 96%であった(Fig. 1)。細胞治療時に広範な壊死や骨髄炎を認め移植後1週間以内に大切断を行った3肢は除外した。これらの3肢については細胞治療の効果に関係なく大切断の適応があると判断された。結果的に両疾患で1肢ずつ(計2肢)が大切断に至ったが、大切断は2カ月以内に行われており、それ以後に大切断に至った症例はなかった。大切断の1例はASOの透析例で、もう1例はTAOの喫煙再開例であった。6カ月以内に大切断を回避された効果例では遠隔期まで細胞治療の効果が維持されていた。

さらに41症例について生存の有無が確認され、平均観察期間76.1カ月間であった。41症例の累積生存率を評価し、ASOでは3年74%、5年59%，TAOでは3、5年ともに100%，100%で死亡例はなかった(Fig. 2)。ASOの死亡例は6例であったが、肺炎、腎不全、腸管

**Figure 1** Amputation-free interval curves after injection.**Figure 2** Overall survival.

穿孔による腹膜炎、突然死がそれぞれ1例、小腸壞死が2例であった。この小腸壞死の2例は上腸間膜動脈虚血に由来するもので血液透析症例であった。死亡例6例中3例が血液透析例であった。治療前に悪性疾患の既往は含まれておらず、血管新生療法後にも悪性疾患の発症はなかった。

考 察

本邦にて虚血肢に対する細胞移植による血管新生療法が開始され10年以上が経過したが、自覚症状および潰瘍治癒率などの臨床症状の改善が示されてきた。また救肢率および生存率ではTASC IIで示された重症虚血肢の予後と比較して良好であった。最近、早期成績だけでなく遠隔期成績を含め、細胞治療の安全性と有効性についての報告が散見されるが、TACT study(自己骨髄単核球細胞移植)の多施設の結果も報告された⁶⁾。当大学の結果を含めた11施設、115症例(ASO 74例、TAO 41例)の結果をASO、TAOの疾患別に統計学的に解析されたが、その報告では多施設の成績を含めても当大学の

ものと同様な結果であった(Table 2)。しかし血流改善効果という面において、少数例で行われた臨床試験にてABI, TcO₂などの血流改善効果が証明されたが、大規模化するに従い有意な血流改善は必ずしも証明されなかった。TACT studyの結果では、治療前よりABIで0.11の増加、TcO₂で17 mmHgの上昇を改善と評価すれば移植前後の結果に有意差を認めていたが、症例の平均値では有意差を認めていなかった。再生血管の評価にはABIは適切とはいえないが、TcO₂やLDBFにおいても種々の因子の影響や術前後の実測値の比較の仕方により解析結果に相違が生じる。以前より虚血肢において血管新生療法の血流改善効果を客観的に評価する方法がないことが課題であった。今後も細胞治療は継続されると考えるが、現状のいくつかの問題点と今後の適応について考察を加える。

1) 血流評価について

これまでの細胞治療や遺伝子治療で行われている血管新生療法は、毛細血管(10 μm)・細動脈(100~200 μm)レベルの組織の血管床を構成する血管再生と考えられる。この程度の血管径を有する再生血管を血管造影で評価することは不可能であり、ABIでは評価困難である。一方で組織の血管床に血液を供給する役目をする小動脈レベルで側副血行路として機能する血管は血管造影でも評価される。前者の毛細血管、細動脈を再生する機序がangiogenesisであり、vasculogenesisである。後者の側副血行路を形成する機序がarteriogenesisであり、組織への虚血部への酸素供給の導管となり得る⁷⁾。よって当施設では下腿動脈の開存している部分の周辺(導管として機能する血管が存在する部位)から末梢側に細胞移植を行い、angiogenesisおよびvasculogenesisを促している。移植1カ月後の血管造影にて術前と比較し44%に改善を認めたが、下腿や足底の筋肉内で血管床が増加することでrun offが良好となり、治療前に描出されなかつ既存の小動脈がより早期に描出された結果、血管影が増加した可能性がある。

血管新生療法後の血流評価法として、①ABI/TBI(toe-brachial blood pressure index), ②TcO₂/LDBF/SPP(skin perfusion pressure), ③血管造影、は行う方針である。①TBIについては足関節以下の血流が評価される。②の項目は皮膚循環動態が反映され、潰瘍治癒との相関について検討される。①②の検査では、血管の石灰化、足趾潰瘍や感染などによる皮膚状態により測定値の

評価が困難な場合があるが今後も検査意義はあると考える。またFontaine分類でIIb-IVの背景が相違する症例を総合し解析を行ったことは血流改善効果を証明できなかつた理由の一つと考える。運動負荷タリウム血流スキャンのような筋血流測定は客観的な評価法として有用であると思われる。

2) 血管新生療法の適応について

血管新生療法が毛細血管・細動脈レベルの再生であることを考えると、下腿動脈以下の狭窄性病変が対象となり、TAOや血管炎などが適応である。TAOは大腿動脈より閉塞している症例もあるが、特徴的な側副血行路が存在し有効性を認めている。血管炎ではABIは比較的保たれており足関節以下に病変を認める場合が多く、血管の閉塞状態に対しては適応と考えるが、膠原病を有する場合は基礎疾患の治療状況も考慮しなければならない。ASOについては下腿動脈以下のバイパスや大腿動脈以下の血管内治療が積極的に行われるようになり、むしろ血管新生療法はハイブリッド治療として有効であると考えている。糖尿病では細小血管障害の状態で腎不全発症前であれば良い適応である。しかし、糖尿病性腎不全の血液透析例ではFontaine IV°(潰瘍・壊死)の救肢率はIII°(安静時疼痛)に比較して不良であり、感染を伴う潰瘍症例には効果が期待できない⁸⁾。対象として、虚血の分類ではFontaine IIb(100 m以下の間歇性跛行), III°が最も良い適応と考える。潰瘍治癒率は60~70%であることから、小潰瘍であれば十分に適応であるが、骨髓炎を合併し足趾を超える潰瘍の場合は血行再建によるダイナミックな血流の改善が必要である。疼痛改善は移植後2~3日以内に自覚されるが、その初期の反応は再生血管による血流改善効果以外の機序も考慮される。

3) 移植細胞について

骨髓単核球細胞にはEPC以外にも血球系、炎症系細胞、さらに間葉系細胞も含まれており、当初、骨形成の可能性も危惧された。G-CSF動員末梢血単核球細胞には骨髓から採取した場合とほぼ同等のCD34陽性細胞が含まれているが、同様に血球系、炎症系細胞が含まれている。以前G-CSFのみでも末梢血を介して虚血部へのEPCの到達、vasculogenesisによる血管再生が示され、臨床試験も行われた。この両者が全く同様な機序で血管新生が行われているとはいえない。浅原らのグループから、G-CSF動員選別CD34陽性細胞移植がラット心筋梗塞モデルで行われ、用量依存性に心機能の改善、梗塞

範囲の減少、微小血管密度の増加を認め、心筋細胞への分化の可能性も示唆された⁹⁾。さらに単核球細胞の移植では血球系および炎症系の細胞が含まれることから、出血性梗塞を来し病的な新生血管を形成する可能性を示した¹⁰⁾。選別 CD34 陽性細胞は血管再生において最も適している細胞と思われ、多分化能を有していることから再生医療のソースとして今後も注目される。

細胞移植の臨床試験の報告では、TAO は ASO よりも有効性が高い傾向にあり、膠原病に関連する血管炎にも適応が拡大されている。ASO の無効例の原因としては動脈硬化疾患の EPC の数や機能の障害が報告されてきた。ASO の細胞治療の効果を改善するためには、EPC の增幅や遺伝子導入による機能強化などが検討されている。これらの方法は培養過程を有するために臨床応用のハードルは高くなるが最も期待される方法である。

結 語

骨髄単核球細胞移植は ASO、TAO ともに有効性は示されたが、TAO でより効果を示したと考える。ASO は動脈硬化疾患であることから採取される EPC の問題点を含め多くの課題を抱えるが、さらなる改良を加え、重症虚血性疾患にも応用可能となることが望まれる。

文 献

- 1) 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
- 2) Minamino T, Toko H, Tateno K, et al: Peripheral-blood or bone-marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis? Lancet 2002; **360**: 2083–2084
- 3) Tateno K, Minamino T, Toko H, et al: Critical roles of muscle-secreted angiogenic factors in therapeutic neovascularization. Circ Res 2006; **98**: 1194–1202
- 4) 岡崎梯之、明石英俊、大塚裕之、他：虚血肢に対する自己骨髄単核球細胞移植による血管新生療法—臨床結果と評価法について—. 脈管学 2005; **45**: 37–43
- 5) 勝田洋輔、有馬 健、外山康之、他：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検討. 脈管学 2007; **47**: 221–225
- 6) Matoba S, Tatsumi T, Murohara T, et al: Long-term clinical outcome after intramuscular implantation of bone marrow mononuclear cells (Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation [TACT] trial) in patients with chronic limb ischaemia. Am Heart J 2008; **156**: 1010–1018
- 7) van Royen N, Piek JJ, Buschmann I, et al: Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. Cardiovasc Res 2001; **49**: 543–553
- 8) Horie T, Onodera R, Akamastu M, et al: Long-term clinical outcomes for patients with lower limb ischaemia implanted with G-CSF-mobilized autologous peripheral blood mononuclear cells. Atherosclerosis 2010; **208**: 461–466
- 9) Iwasaki H, Kawamoto A, Ishikawa M, et al: Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction. Circulation 2006; **113**: 1311–1325
- 10) Kawamoto A, Iwasaki H, Kusano K, et al: CD34-positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization after myocardial infarction compared with total mononuclear cells. Circulation 2006; **114**: 2163–2169

Therapeutic Angiogenesis for Ischemic Limbs by Autologous Transplantation of Bone-marrow Mononuclear Cells

Teiji Okazaki,¹ Yousuke Katsuta,³ Ken-ichiro Sasaki,² Ken Arima,² Yutaka Saito,² Yasuyuki Toyama,² Yoshio Katsuki,²
Masanori Otsuka,² Takaharu Nakayoshi,² Hiroyuki Otsuka,¹ Kurando Kanaya,¹ Yoshinori Yokokura,¹
Eiji Nakamura,¹ Shinichi Hiromatsu,¹ Hidetoshi Akashi,¹ and Tsutomu Imaizumi²

¹Department of Surgery, Department of Internal Medicine, Kurume University School of Medicine, Fukuoka, Japan

²Division of Cardio-Vascular Medicine, Department of Internal Medicine, Kurume University School of Medicine, Fukuoka, Japan

³Department of Cardiovascular Medicine, Fukuoka City Medical Association Hospital, Fukuoka, Japan

Key words: therapeutic angiogenesis, bone-marrow mononuclear cell, peripheral arterial disease

Autologous transplantation of bone-marrow mononuclear cells (BMMNCs) was performed in 53 limbs of 50 patients with non-healing ischemic ulcers (n=32/50), rest pain (n=7/50) and intermittent claudication (n=11/50) due to peripheral arterial occlusive disease. Fifteen had arteriosclerosis obliterans (ASO), thirty-three had thromboangiitis obliterans (TAO; Buerger's disease) and two had conditions. Visual analog scale (VAS) and pain-free walking distance (PFWD) improved significantly at 6 months after BMMNCs injection and ulcers had healed completely in 66.7% in 6 months. But we could not show blood flow improvements with ankle-brachial blood pressure index (ABI), transcutaneous oxygen pressure (TcO₂) and laser-Doppler blood flow (LDBF). Three years amputation-free rate was 96% in patients with ASO and 92% in patients with TAO. Three and five year overall survival rates were 74%, 59% respectively in patients with ASO. No patients with TAO died. The angiogenic cell therapy using BMMNCs can induce long-term improvement in limb ischemia, leading to an extension of amputation-free intervals.

(J Jpn Coll Angiol, 2011, **51**: 441–446)