

透析患者の下肢閉塞性動脈硬化症に対する幹細胞治療

堀江 卓 川村明夫 津田一郎 本望 聡 安部美寛 江川宏寿 池田 篤 飯田潤一
坂田博美 小野寺一彦 玉置 透 久木田和丘 目黒順一 米川元樹

特定医療法人北楡会 札幌北楡病院 外科

key words : 血液透析, ASO, CD 34 陽性細胞, 末梢血幹細胞, G-CSF

要 旨

ASO を伴った血液透析患者を中心に末梢血幹細胞による血管再生治療を行った。65 例に行い、40 例は救肢された。切断の危険因子は糖尿病、壊疽だった。また、メカニズムの解明とコントロールとの比較目的にビーグル犬による実験を行った。毛細血管の増生と血管内皮形成をみとめた。

はじめに

当院では、閉塞性動脈硬化症 (ASO) を伴った血液透析患者を中心に、末梢血幹細胞による血管再生治療を行ってきた。今回、今までの臨床研究、およびそのメカニズムの解明とコントロールとの比較を目的に実験研究を行ったので報告する。

1 臨床研究

1) 目的

今回の臨床研究の目的は、ASO や糖尿病性血管障害の患者の四肢に末梢血幹細胞 (CD 34 陽性細胞) を局所注射して末梢血管の再生を図ることである。

すでに室原¹⁾、松原²⁾および Tateishi-Yuyama³⁾らにより ASO の患者に骨髓移植法に準じて骨髓単核球を約 1×10^9 個⁴⁾採取分離し、虚血下腿屈側骨格筋内に移植後、1 カ月で血流の回復、疼痛の軽減を認めたとの報告はある。ただし、骨髓採取には全身麻酔や自己

血輸血が必要で、患者の負担が大きい。そこで、血管内皮前駆細胞¹⁾と考えられる CD 34 陽性細胞を骨髓からではなくアフェレンスによる末梢血採取法 (PBSCC)⁴⁾により調整した。

同法は末梢血幹細胞移植時の採取法としてすでに当院で行われていて、健常者ドナーからの 1 回の PBSCC で $10 \sim 50 \times 10^9$ 個の単核球、 $1 \sim 50 \times 10^7$ 個の CD 34 陽性細胞の採取が可能である。したがって、採取液を筋肉内に投与することで骨髓採取から得られた単核球を用いるのと同様かそれ以上の血管再生効果が期待された。さらに、採取液から CD 34 陽性細胞のみを純化^{5, 6)}しようとするに 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 CD 34 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。

2) 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、循内受診、脳 CT 等で確認した。

ついで、G-CSF $5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を 4 日間毎日皮下注射した。透析患者は透析後に投与した。毎日血液検査を行い、白血球数が 5 万を越えたら $2.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ に減量した。4 日目に PBSCC (末梢血幹細胞採取) を CS-3000 または Spectra を用いて行った。非透析患者は W ルーメンカテーテルを挿入し、また透析患者はシ

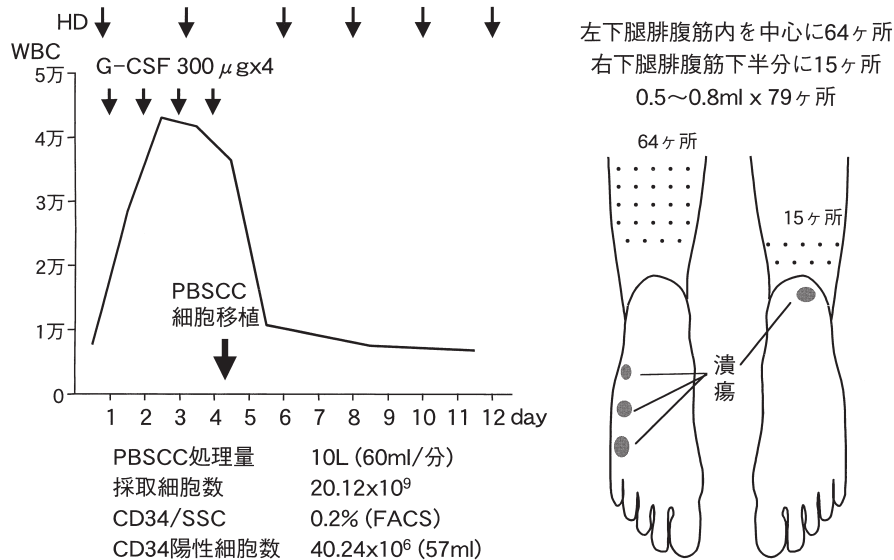


図1 PBSCCと細胞移植(症例1)

ャント血管を用いた。採取されたCD34陽性細胞数をフローサイトメトリー(FACScan)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、上肢は腕神経叢ブロック、下肢は腰麻による。術後1週間は白血球数や凝固系の変動を観察した。治療効果の判定は、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および血管造影による。

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^{4,7)}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。さらに、PBSCCの副作用、CD34陽性細胞投与の効能、利益・不利益を提示し、患者、家族が承諾した場合に施行することにした。

3) 結果

現在までに65例に行った。年齢は44~86歳(平均66.5歳)。男40例、女25例で、血液透析中の患者が48例(73.8%)を占めた。平均透析歴は7.4年だった。一方、糖尿病合併例は48例で、血液透析例48例中38例(79%)が糖尿病だった。足に治療したのが62例、手が4例(左手足が1例)で、Fontaine1度が3例、2度6例、3度14例、4度が42例あった。

移植したCD34陽性細胞数は $0.18 \sim 15.9 \times 10^7$ (平均 3.5×10^7)個で、改善が22例(観察期間が1~29

カ月)、変化なし18例(1~21.5カ月)、切断が25例(0.4~26カ月)あった。切断は24例がFontaine4度で14例は壊疽を伴っていた。また、1カ月以内に切断となった例は8例あり、全例がFontaine4度で、7例が男性で血液透析を行い、また糖尿病を合併し、6例が壊疽を伴っていた。全症例を通しての救肢率は61.5%だった。

治療前での各種検査の結果は、サーモグラフでは65例中47例に低温領域を認めた。プレチスモグラフでは、64例中49例で脈波が消失した。3D-CTでは、血管描出が不良であったのは59例中53例あった。ABIは、治療後救肢されている25例で平均0.48、切断となった18例は0.39だった。

治療後1カ月での自覚症状とサーモグラフの改善のパターン、およびプレチスモグラフと3D-CTのパターンが似ていた。一方、ABIでは、変わらない例が多かった。

次に症例を示す。

① 症例1

68歳女性。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4万台まで上昇した(図1)。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

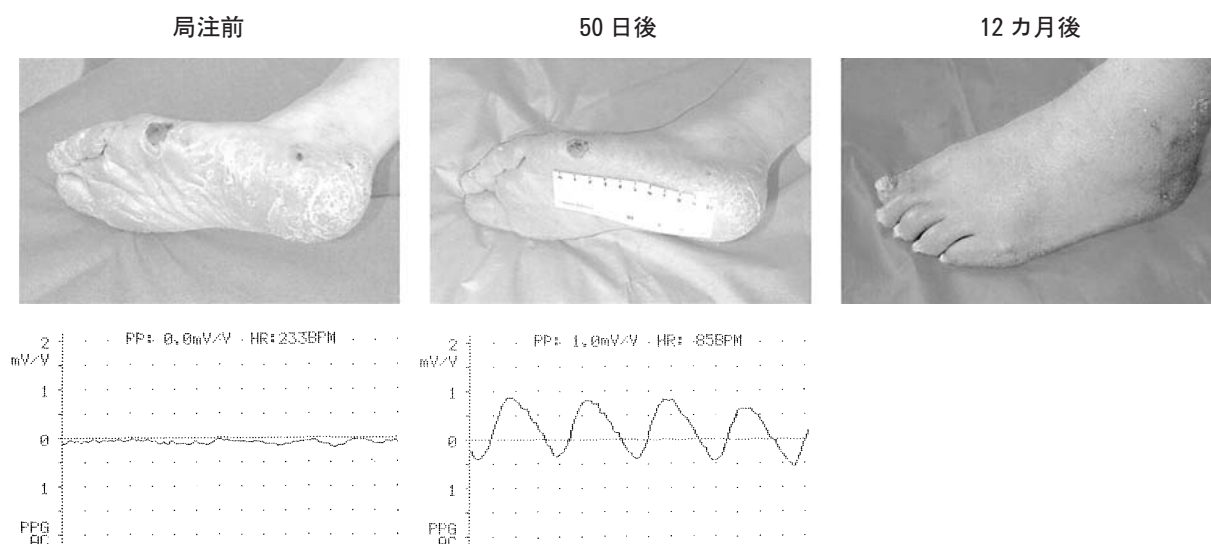


図2 細胞移植前後の経過 (症例1)

陽性細胞数はフローサイトメトリーにより 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。

なお採取液中には赤血球が240万/ μl 、血小板が80万/ μl の濃度で混在していた。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(図2)。12カ月後には潰瘍は消失した。

② 症例5

56歳男性。ASO, CRF (HD中), DMあり。主訴は両足壊疽, 左前腕の疼痛と, 3, 4指のチアノーゼ。2001年12月より血液透析を導入。2002年4月, 右足壊疽のため膝下切断。7月より左前腕の冷感, 疼痛が出現。8月には左第1趾が壊疽となり切断, 左上肢の鎮痛にNSAIDを処方し, 9月に胃潰瘍を併発。10月に細胞治療を行った。

64mlの採取液を133カ所皮下注, 筋注した。術直後は左手がグローブのように腫脹したが, 次第に軽減。1カ月後にはチアノーゼや疼痛は改善し, プレチスモグラフでは脈波が出現した。

③ 症例42

細胞治療後6.5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。

④ 症例58

最近治療効果の判定に血流シンチグラフィを用いている。 $^{99\text{m}}\text{Tc-HSA}$ 1~2mlを静注し, 腹部大動脈, 後脛骨動脈, 足尖部などの血流を測定する。症例58

は各領域での改善を認めた。

4) 考察

Isner⁸⁾, Asahara⁹⁾, Shintani¹⁰⁾, 室原¹⁾らは, 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¹⁾, 松原²⁾およびTateishi-Yuyama³⁾らにより開始された。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による)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²⁾下肢の血流増加は保たれた。

また, 稲葉^{5, 6)}らは, 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¹¹⁾らは, 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, Asahara⁹⁾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^{5, 6)}らの方法に準じて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ほか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。

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とした。また、プレチスモグラフと3D-CTの改善パターンがほぼ同様のことより、下腿3分枝での血流の増加により、趾尖の脈も改善されたが、ABIで変わらなかった例が半数を占めていたことより、血流は増加しても、足関節での血圧を上げるほどのものではなかったと考えた。つまり、阻血肢において血流を増やし、温度を上げ、趾（または指）尖での脈波を改善させようが、血圧を上げるほど強力ではなかった。一方、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、血流が増加すると考えた。

適応について室原¹⁾らは、ASO、バージャー病でほか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。また、松原²⁾らは同様に、外科や内科治療にて改善しないASO、バージャー病でFontaine 3~4度の虚血肢を有する患者とした。除外例はコントロール不良の糖尿病、網膜症、悪性腫瘍例であった。

当初、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65例中25例発生した。切断の危険因子は、糖尿病、Fontaine 4度および壊疽の合併である。

糖尿病48例中切断となったのは24例(50%)あったが、非糖尿病17例中切断は1例(6%)のみだった。一方血液透析患者48例中切断となったのは21例(44%)で非透析17例中切断は4例(24%)で、糖尿病のほうがより危険と考えられた。

Fontaine 4度で特に壊疽を合併すると、切断の危険は増大する。したがって、壊疽が指趾をこえる場合は、非適応と考えられる。一方、指趾にとどまる場合は細胞治療の際デブリードメントを行い、壊疽部を可及的に切除することで、成績向上を目指したい。

PBSCを行う上で日本造血細胞移植学会のガイドライン¹²⁾があり、基礎疾患として冠動脈疾患、脳血管障害、糖尿病を有する人、癌の既往のある人はG-CSF投与を避けるか慎重に行うようにされている。海外では末梢血幹細胞ドナーの死亡例⁷⁾もあることより、当院倫理委員会でも上記除外項目が設定された。

65例中ほとんどの症例が慎重投与例にあたるが、心エコー、心筋シンチおよび脳CTで重篤な所見がなければ、あるいはあっても循環器内科等で良好にコントロールされていれば、G-CSFやPBSCに伴う重大な合併症はなく、安全に治療できた。

2 実験研究

1) 目的

犬の虚血肢に対してPBSCを筋注することで血管新生が促されることを確認することと、コントロールとして生食を筋注し、比較検討をする。

2) 方法

ビーグル犬(雌)体重8~10kgの大腿動脈を結紮し虚血肢モデルとする。G-CSF 2 μ g/kgを7日間皮下注後、7日目にPBSCを行う。使用器械は人と同じSpectraを用いた。総頸動脈より脱血し、前肢の皮静脈に返血した。採取されたPBSCを内転筋や簿筋に筋注する。

観察項目は、①血管造影により大腿動脈結紮直後と4週間後とで、血管新生が出現しているか確認する。②内転筋ないし簿筋を生検し、組織学的に血管新生があるか評価する。また採取されたPBSCを蛍光色素でマーキングした上で筋注し、アルカリフォスファターゼ(AP)染色¹⁰⁾と比較して、血管内皮となっているか観察した。

対象を、①生食動員後生食筋注、②G-CSF動員後生食筋注、および、③G-CSF動員後PBSC筋注に分けた。

3) 結果

① 生食動員後生食筋注 (n=1)

血管造影では、新生血管の発達で大腿動脈の再疎通を認めた。

② G-CSF動員後生食筋注 (n=1)

G-CSF投与により白血球数は11,150から36,700に増加した。血管造影では、①群と同様に新生血管の発達で大腿動脈の再疎通を認めた。

③ G-CSF動員後PBSC筋注 (n=4)

G-CSF投与により白血球数は平均11,175から35,353に増加した。CD34陽性細胞は、平均 3.80×10^6 個採取された。血管造影では新生血管の発達で大腿動脈は

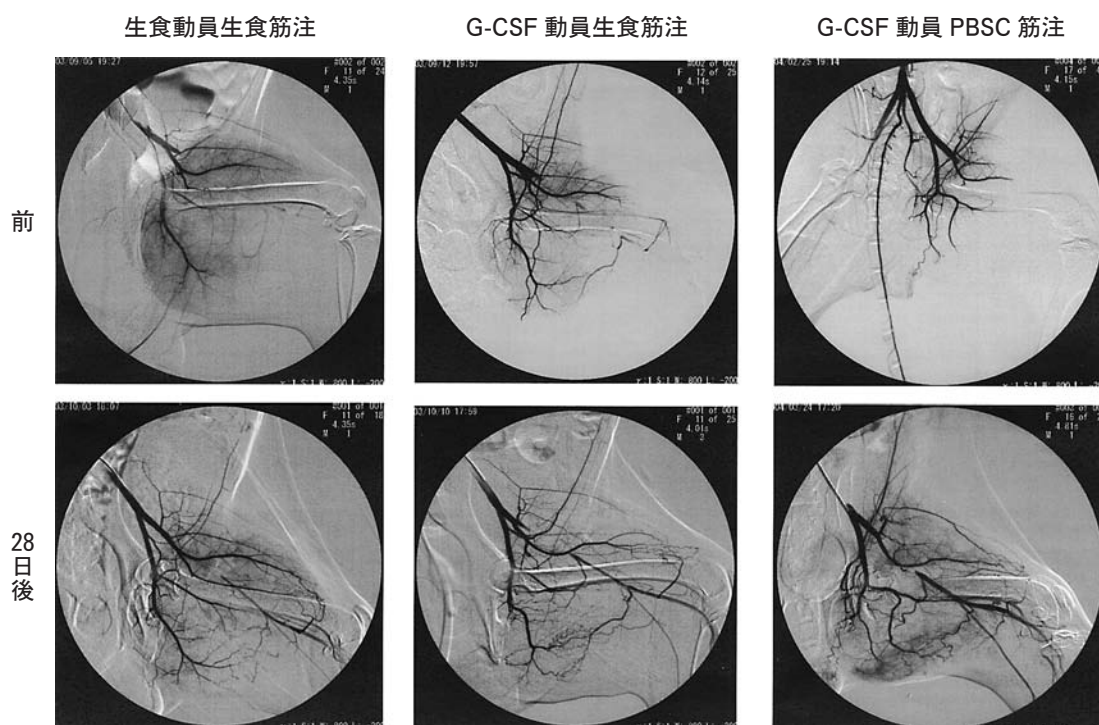


図3 血管造影（動物実験）

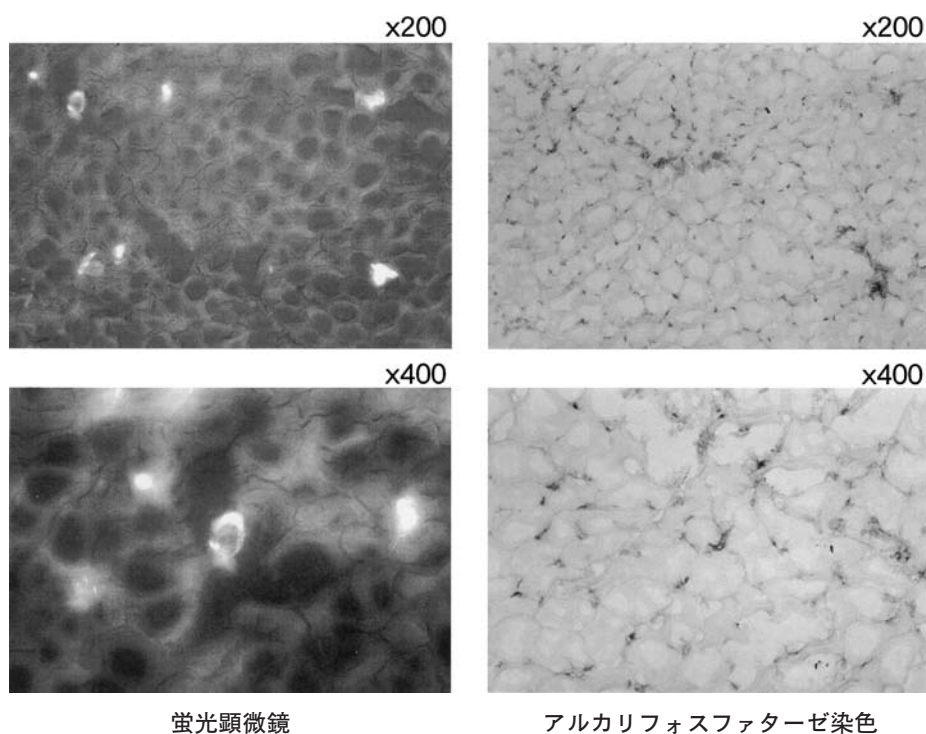


図4 G-CSF 動員 PBSC（蛍光染色）筋注（4週後）

再疎通。①，②群よりやや多く毛細血管の発達を認めた（図3）。

組織学的には，③群で，2日後，14日後に細胞塊が筋線維の間に認められた。14日後の細胞塊は，APが陽性に染まった。さらに4週後には，蛍光を発する細胞に一致してAPが陽性に染まった。14日後のよう

に塊状でなく散在性にあった。また形状からも血管内皮を疑う円形の細胞を認めた（図4）。

4) 考察

血管造影では，G-CSF 動員 PBSC 筋注群が，ほかの2群に比べて毛細血管が発達した。つまり，コント

ロールに比べて細胞治療は有効と考えられた。また、G-CSFで動員のみを行い、虚血肢に生食を筋注しても、コントロールとほとんど変わらないことから、虚血肢に直接PBSCを筋注するほうが有効である。

今回は、G-CSFを用いないで、PBSCを採取することは行っていないが、採取されるCD34陽性細胞は少なくなり、やはり、効果は下がると思われる。

組織学的に、14日後まで筋注した細胞が塊状に存在し、さらにAP染色陽性であることから、血管内皮になってきたと考えられた。さらに、4週後の所見で、円形の細胞が蛍光を発し、APも陽性に染まったことより、筋注したPBSCが毛細血管内皮を形成する可能性が高まった。つまり、細胞治療のメカニズムを説明する所見と考えられた。

文 献

- 1) 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, 19; 847, 2001.
- 2) 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, 50; 349, 2002.
- 3) 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 randomized controlled trial. *Lancet*, 360; 427, 2002.
- 4) 関口定美, 池淵研二: 末梢血幹細胞採取. アフェレシスマニュアル; 日本アフェレシス学会編, 秀潤社, 東京, p. 105, 1999.
- 5) 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. 日本アフェレシス学会雑誌, 21; 93, 2002.
- 6) Inaba S, Egashira K: Peripheral-blood or bone-marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis? *Lancet*, 360; 2083, 2002.
- 7) 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, 11; 1225, 2001.
- 8) Inzer JM, Asahara T: Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest*, 103; 1231, 1999.
- 9) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al.: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275; 964, 1997.
- 10) Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al.: Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation*, 103; 897, 2001.
- 11) 高倉伸幸: 血液細胞と血管新生. 最新医学, 56; 1722, 2001.
- 12) 日本造血細胞移植学会, 日本輸血学会: 同種末梢血幹細胞移植のための健常人ドナーからの末梢血幹細胞の動員, 採取に関するガイドライン, 2000年7月21日(第2版).