

重症下肢虚血に対する骨髓単核球
移植治療後の予後因子

Prognostic Factors of Critical Limb
Ischemia After Autologous Bone
Marrow Implantation

小田 雅人
加藤 公則
鳥羽 健*¹
大瀧 啓太
北嶋 俊樹*¹
五十嵐 登
柳川 貴央
東村 益孝*¹
浅見 冬樹*²
礪田 学*²
小澤 拓也
森山 雅人*¹
廣野 暁
大倉 裕二
塙 晴雄
小玉 誠
相澤 義房

Masato ODA, MD
Kiminori KATO, MD
Ken TOBA, MD*¹
Keita OTAKI, MD
Toshiki KITAJIMA, MD*¹
Noboru IKARASHI, MD
Takao YANAGAWA, MD
Masataka HIGASHIMURA, MD*¹
Fuyuki ASAMI, MD*²
Manabu ISODA, MD*²
Takuya OZAWA, MD
Masato MORIYAMA, MD*¹
Satoru HIRONO, MD
Yuji OKURA, MD
Haruo HANAWA, MD
Makoto KODAMA, MD
Yoshifusa AIZAWA, MD, FJCC

Abstract

Objectives. Autologous bone marrow implantation (BMI) is effective to treat critical limb ischemia, but the long-term prognosis is not clear. The outcome of BMI treatment for ischemic legs was investigated related to the clinical background of the patient, and short-term effects of BMI. The end event was defined as unexpected lower limb amputation.

Methods and Results. This study included 21 consecutive patients (mean age 60.0 ± 13.6 years) with peripheral arterial disease who underwent BMI between December 2001 and March 2005. Twelve patients had arteriosclerosis obliterans (ASO), 5 had Buerger disease (thromboangiitis obliterans), 3 had thromboembolism, and 1 had hypereosinophilic syndrome. The patients with ASO had severe complications such as diabetes and hyperlipidemia. The total number of transplanted CD34-positive cells, ankle-brachial pressure index (ABI), and tissue oxygen pressure (TcO₂) were lower in ASO patients than non-ASO patients. Significant risk factors for the event were diagnosis of ASO and low TcO₂ (< 30 mmHg) according to the Kaplan-Meier survival curve and log rank test. All 6 patients who required limb amputation had ASO simultaneously with low TcO₂ (6 of 9, 67%). In contrast, there was no correlation between the end event and short-term effect of BMI such as improvements in ABI and TcO₂.

Conclusions. Treatment with BMI could not save legs in some patients with ASO associated with severe leg ischemia.

J Cardiol 2007 Oct; 50(4): 235–242

新潟大学大学院医歯学総合研究科 循環器学分野, *¹血液学分野, *²心血管外科学分野: 〒951-8510 新潟県新潟市旭町通一番町754

Divisions of Cardiology, *¹Hematology, and *²Cardiovascular Surgery, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata

Address for correspondence: ODA M, MD, Division of Cardiology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Asahi-dori Ichiban-cho 754, Niigata, Niigata 951-8510; E-mail: odamasato@pop01.odn.ne.jp

Manuscript received May 10, 2007; revised May 31, 2007; accepted June 9, 2007

Key Words

- Ischemia (critical limb, bone marrow implantation) ■ Cells (CD34-positive)
- Blood pressure determination (ankle-brachial pressure index)
- Blood flow (tissue oxygen pressure)

はじめに

複数の疫学研究による末梢動脈疾患の総有病率は3-10%であり、そのうち実際に症状を有する患者は50%、また安静時疼痛や皮膚潰瘍を有する重症下肢虚血(critical limb ischemia)患者は1-3%程度とされる¹⁾。重症下肢虚血例の1年後の転帰は、おおよそ45%が両下肢とも生存、30%が下肢切断、25%が死亡である¹⁾。重症下肢虚血例の約50%で血行再建術が可能であるとされているが、血行再建不能例および無効例に対する薬物治療の成績は極めて悪く、6ヵ月以内に40%が下肢切断、20%が死亡に至っており¹⁾、このような最重症の患者に対して有効な新しい治療法が望まれていた。

これに対する方策の一つとして、我が国では骨髓細胞移植治療(bone marrow implantation)が行われ、多施設研究の成果が報告された²⁾。本治療における当初の目的は、血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell)³⁾を多く含む自家骨髓単核球分画を虚血下肢に移植することで血管再生(vasculogenesis)を誘導することであった。しかし、我々の動物モデルを用いた研究では、移植骨髓中に含まれる赤芽球が複数の血管増殖因子を分泌することによって誘導される血管新生(angiogenesis)が主体であることが示された⁴⁾。

骨髓細胞移植治療の短期的効果の解析では有効性が明らかであったが²⁾、長期的効果に関する報告はない。我々は当施設で経験した骨髓細胞移植治療症例をもとに、下肢切断を回避しえたか否かを指標とした長期的効果に対する予後因子を解析したので報告する。

対象と方法

1. 対象患者

慢性下肢虚血患者のうち、Fontaine IIb(200 m以下の歩行で間欠性跛行を呈する)、Fontaine III(安静時疼痛を有する)およびFontaine IV(下肢に皮膚潰瘍を有する)で、従来法(バイパス術・カテーテル治療)の適応がない患者を対象とした。ヘモグロビンA_{1c}が6.5%以

上または増殖型網膜症を合併した糖尿病患者、および過去5年以内に癌を発症した患者は除外した。治療プロトコルは当施設に設置の倫理委員会に提出し、承認を得た。全例で口頭および文書による治療の説明と同意を得たのちに治療を行った。

2. プロトコル

患者腸骨より全身麻酔下で500-1,000mlの骨髓液を採取し、CS3000-Plus blood-cell separator (Baxter, Deerfield)を用いて95%の純度に分離した骨髓単核球を50mlに濃縮し、1mlずつ虚血部位の50ヵ所に筋注した。

治療後1ヵ月間は、上肢下肢血圧比(ankle-brachial pressure index: ABI)および経皮的組織酸素分圧(transcutaneous tissue oxygen pressure: TcO₂)の測定を週1回行った。ABIはvolume-plethymographic apparatus (form PWV/ABI; Colin, Komaki) (正常値>0.9)⁵⁾を用いて測定し、TcO₂はOxymonitor (PO-850, Sumitomo-Hightechs) (正常値>60mmHg)⁶⁾を用いて測定した。

3. 観察期間

2001年12月-2005年3月に骨髓細胞移植治療を施行した21例について、2006年12月までの観察結果(平均観察期間29.6±14.4ヵ月)を解析した。治療前にすでに下肢壊死が存在し、治療前に予想した切断範囲を超えた下肢切断に至った場合を「イベントあり」と定義した。切断範囲は、足部、膝下、膝上に分類した。

4. 統計学的解析

治療前後における各指標の変化については対応のあるt検定を用いた。イベントの有無との関連に関する検討は χ^2 検定を用いた。下肢生存曲線はKaplan-Meier生存曲線解析を用いて検討した。すべての数値は平均±標準偏差を用いて表し、 $p < 0.05$ を有意差の判定とした。

Table 1 Clinical characteristics

	ASO (n=12)	Non-ASO				All patients (n=21)
		Buerger (n=5)	Thromboembolism (n=3)	HES (n=1)	Total (n=9)	
Age (yr)	64.0±9.1	43.6±11.7	72.7±10.1	55	54.6±17.1	60.0±13.6
Sex						
Male	10(83)	5(100)	3(100)	1	9(100)	19(90)
Lifestyle habit						
Smoking	10(83)	5(100)	1(33)	1	7(78)	17(81)
Previous treatment						
Bypass graft	4(33)	0	0	0	0	4(19)
Complications						
Hypertension	9(75)	0	3(100)	1	4(44)	13(62)
Hyperlipidemia	5(42)	0	0	0	0**	5(24)
Diabetes mellitus	8(67)	0	1(33)	0	1(11)**	9(43)
CRF(hemodialysis)	4(33)	0	0	0	0	4(19)
Implanted cell number						
MNC(10 ⁹ cell)	2.52±1.06	3.30±1.47	4.03±2.27	4.61	3.69±1.62	3.02±1.42
CD34(10 ⁷ cell)	3.80±4.12	8.52±4.53	15.58±16.36	6.5	10.65±9.55**	6.73±7.61
Fontaine classification						
II b	2(17)	0	2(67)	0	2(22)	4(19)
III	3(25)	1(20)	1(33)	0	2(22)	5(24)
IV	7(58)	4(40)	0	1	5(56)	12(57)
Ischemic status						
ABI	0.34±0.35	0.71±0.21	0.42±0.32	0.93	0.64±0.28**	0.47±0.35
TcO ₂ (mmHg)	17.8±16.4	34.8±25.8	42.3±11.1	37	37.6±19.4**	26.3±20.0

Continuous values are mean±SD. (): %. **p<0.05 vs ASO.

ASO=arteriosclerosis obliterans; HES=hypereosinophilic syndrome; CRF=chronic renal failure; MNC=mononuclear cell; ABI=ankle-brachial pressure index; TcO₂=tissue oxygen pressure.

結 果

1. 患者背景

Table 1に患者背景を示す。ASO患者12例と非ASO患者9例の比較では、Fontaine分類による臨床症状の重症度分布がほぼ同等であったが、両群間で以下の有意差がみられた。1)高脂血症と糖尿病の頻度がASO患者に多かった。2)移植されたCD34陽性細胞数がASO患者で少なかった。3)TcO₂およびABIがASO患者で低値であった。以上のことから、ASO患者では虚血の程度がより強く、また骨髓が低形成であることが推測された。

2. 長期予後因子

骨髓細胞移植治療の4週間後における短期効果を

Figs. 1, 2に示す。ABI値、TcO₂値のいずれも治療後に改善していた (ABI: 治療前0.467±0.351, 4週間後0.545±0.357, p<0.05; TcO₂: 治療前26.3±20.0 mmHg, 4週間後34.9±17.3 mmHg, p<0.05)。治療前後の測定値の変化ΔABIおよびΔTcO₂ともにイベントの有無とは関連がないことから、骨髓細胞移植治療の短期効果からは下肢切断の予測はできなかった (**Table 2**最下段)。Table 2にイベントの有無に影響する因子を示した。長期予後の悪い患者は、ASO群および治療前のTcO₂が低値の患者であった。

イベントの有無に影響のあった因子であるASO群およびTcO₂低値群の下肢生存曲線を**Fig. 3**に示す。両因子ともに長期予後を有意に規定する因子であった。以上の結果を**Fig. 4**にまとめた。6例の予後絶対不良患者はすべてTcO₂が30 mmHg未満のASO例であっ

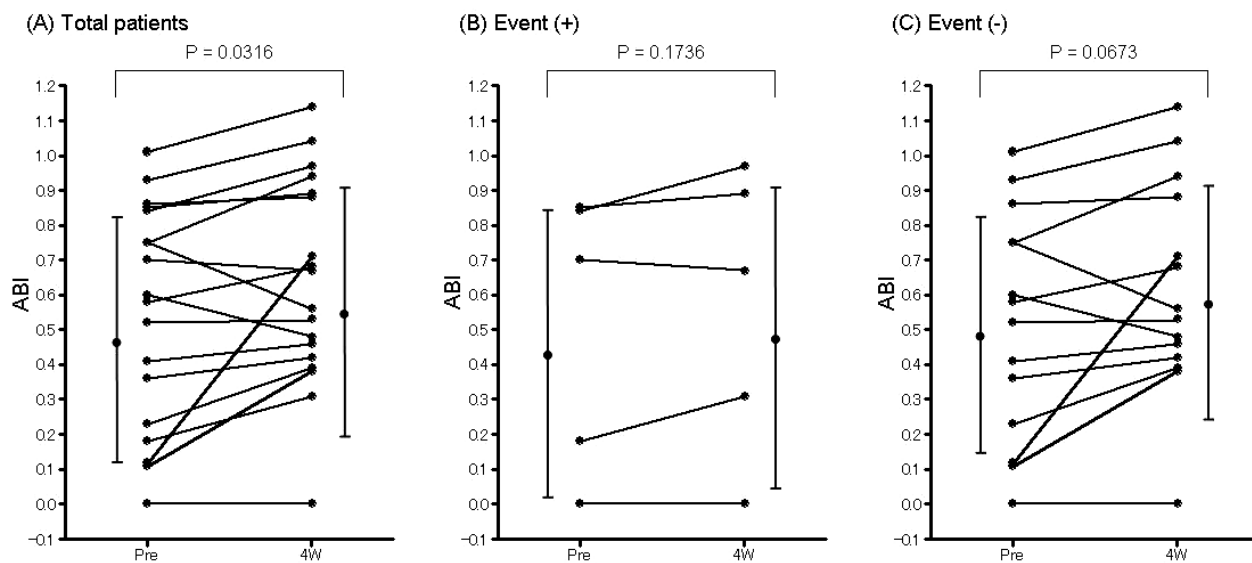


Fig. 1 Change of ankle-brachial pressure index before and 4 weeks after bone marrow implantation

The ankle-brachial pressure index as measured before and 4 weeks after autologous bone marrow implantation in all patients (A, $n = 21$), patients with events (B, $n = 6$), and those without events (C, $n = 15$). W = weeks. Other abbreviation as in Table 1.

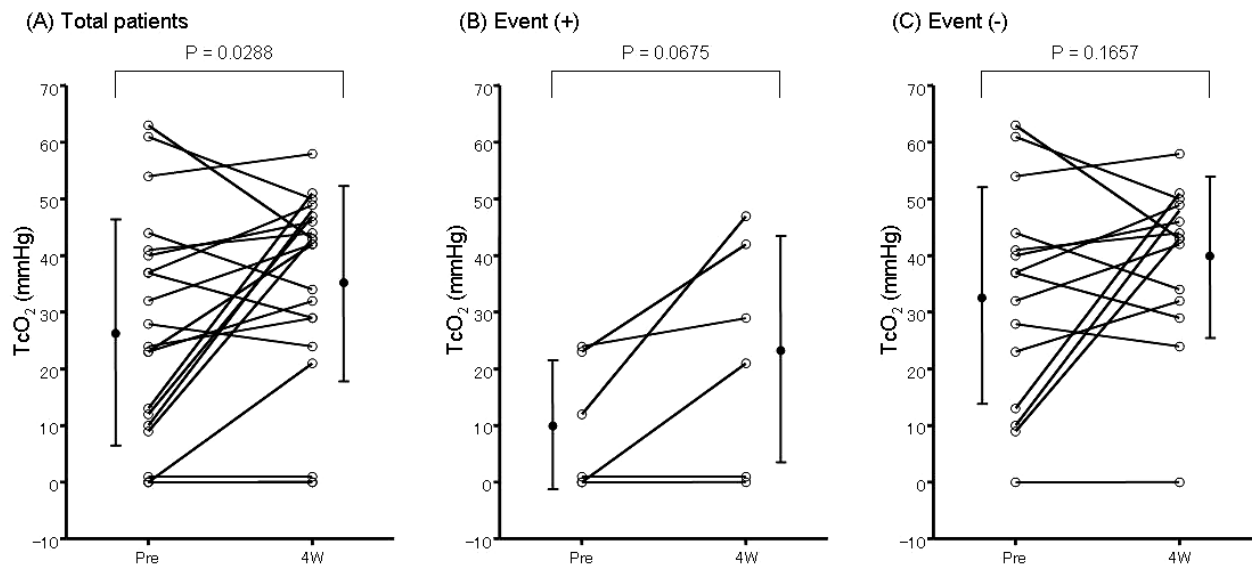


Fig. 2 Change of tissue oxygen pressure before and 4 weeks after bone marrow implantation

The transcutaneous tissue oxygen pressure as measured before and 4 weeks after autologous bone marrow implantation in all patients (A, $n = 21$), patients with events (B, $n = 6$), and those without events (C, $n = 15$). Abbreviations as in Table 1, Fig. 1.

Table 2 Medical conditions and contributing factors to events

	Event (+) (n=6)	Event (-) (n=15)	p value
Age (yr)	64.0±7.5	58.3±15.3	0.3641
Sex			
Male	5(83)	14(93)	0.4807
Diagnosis			
ASO	6(100)	6(40)	0.0121
Previous treatment			
Bypass graft	2(33)	2(13)	0.2917
Lifestyle habit			
Smoking	6(100)	11(73)	0.1598
Complications			
Hypertension	4(67)	9(60)	0.7763
Hyperlipidemia	2(33)	3(20)	0.5169
Diabetes mellitus	3(50)	6(40)	0.6757
CRF(hemodialysis)	2(33)	2(13)	0.2917
Implanted cell number			
MNC (10 ⁹ cell)	2.37±0.94	3.26±1.52	0.1494
CD34 (10 ⁷ cell)	3.57±2.52	8.00±8.63	0.1261
Fontaine classification			
IIb	2(33)	2(13)	0.2917
III	0	5(33)	0.1052
IV	4(67)	8(53)	0.5770
Ischemic status			
TcO ₂ (mmHg)	10.0±11.4	32.8±19.1	0.0041
ABI	0.43±0.41	0.48±0.34	0.7608
Short-term effect			
TcO ₂ (mmHg)	13.3±14.0	6.7±17.8	0.4292
ABI	0.045±0.069	0.092±0.180	0.5460

Continuous values are mean±SD. (): %.
Abbreviations as in Table 1.

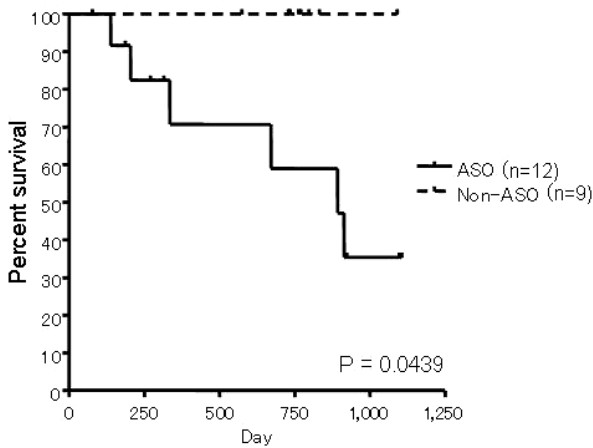
た。Fig. 5 に予後絶対不良6例の下肢切断術に至った経過を示す。治療から下肢切断までの平均期間は389±159日であり、そのうち2例は半年以内に、1例は半年から1年の間に下肢切断に至っていた。

考 察

骨髓細胞移植治療後の短期効果に影響する因子を調べた報告はわずかであるが存在する。一つは、我々の行った解析で移植した骨髓細胞中に占めるCD34陽性細胞数が多いほど骨髓細胞移植治療後効果が得られた⁷⁾。ほかには、移植した骨髓細胞中の赤芽球比率が高いほど骨髓細胞移植治療効果が高く、好中球の比率が低いほど骨髓細胞移植治療効果が得られなかったと

の報告⁸⁾があるが、十分な長期成績に影響する因子についての解析した報告はない。今回の検討から、ASO症例でかつ治療前のTcO₂低値例の9例において、6例の症例が下肢切断術を施行された。下肢切断術を免れている3例との比較検討においては、合併症(高血圧、高脂血症、糖尿病、透析歴)や喫煙歴、移植された骨髓単核球数、ASO罹病期間には明らかな相違はなかったが、例数が少ないため統計学的検討は行っていない。いずれにしても、このような症例においては、長期的には下肢切断に至る可能性が高いことが推測された。また、短期的な自覚症状の改善や客観的虚血の指標の改善は、長期における下肢生存には影響しないと思われた。また、非ASO患者では、短期的な

(A) ASO patients



(B) TcO₂

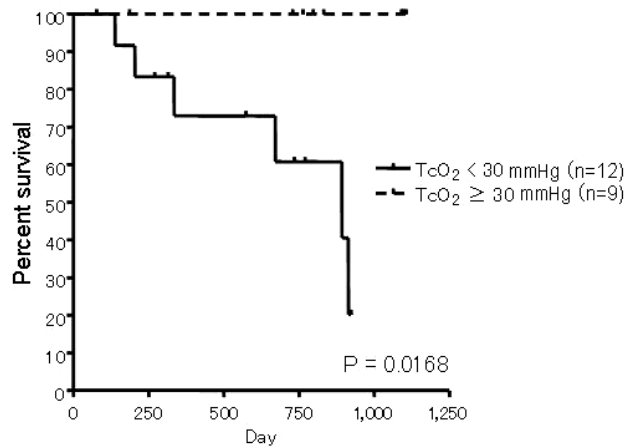


Fig. 3 Survival curve of ischemic legs implanted with bone marrow

The patients with ASO revealed poor prognosis compared with non-ASO patients (A), and the patients with very severe leg ischemia (TcO₂ < 30 mmHg) showed poorer prognosis than those with relatively slight leg ischemia (B).

Abbreviations as in Table 1.

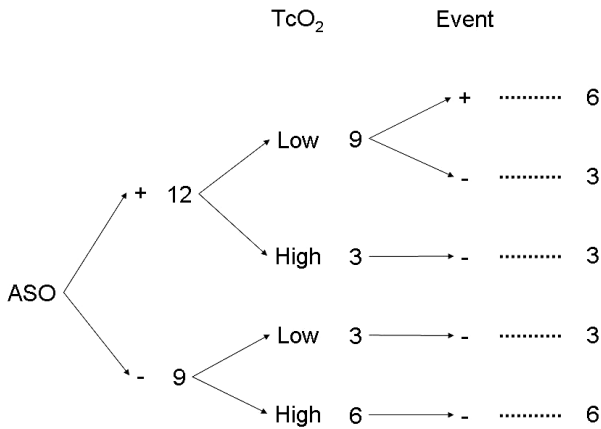


Fig. 4 Schematic summary of prognosis of the ischemic legs

Patients with ASO (+) and non-ASO (-); patients with very severe leg ischemia (Low, TcO₂ < 30 mmHg) or otherwise (High); patients requiring leg amputation (Event +) or otherwise (-). Number of the patients is shown.

Abbreviations as in Table 1.

治療効果にかかわらず長期予後が比較的良好であった。

骨髄細胞移植治療によって形成される新生血管は主に微小血管と考えられており、血管造影検査でみられる太い動脈の血流改善は、それ自体が新生されたものではなく、側副血行路の出現による血流の再開であると理解されている。短期的効果としての微小血管新生

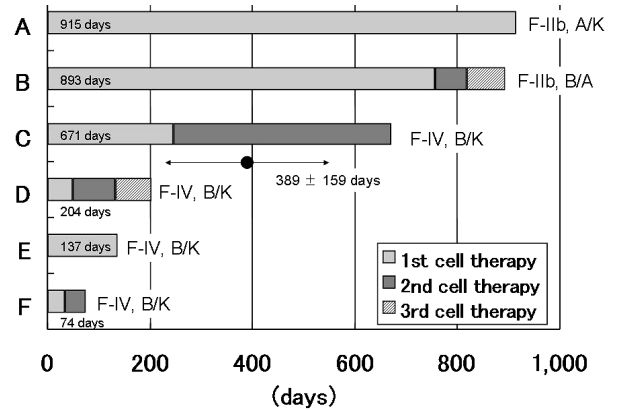


Fig. 5 Schematic summary of the clinical courses of the 6 patients requiring leg amputation

The grades of Fontaine classification (F) before bone marrow implantation therapy and the levels of amputation (A/K, above knee; B/K, below knee; B/A, below ankle) are shown.

は、臨床症状の改善をもたらすものの、最重症例での長期予後の改善にはつながっていない。このようなASO患者には、糖尿病、高脂血症、血液透析中などの複雑な動脈硬化因子が存在し、骨髄細胞移植治療によって新生された微小血管も遠からず動脈硬化の進展によって疲弊するものと推測される。

一方、下肢の生存効果ではないものの延命効果が骨

髄細胞移植治療後によってもたらされる可能性はある。Fontaine IIIまたはIVの患者で下肢切断に至った症例は17例中4例(24%)で、1年以内に下肢切断に至った例は3例(18%)であった。これは重症下肢虚血の自然予後で1年間に下肢切断に至る比率が25%であり⁹⁾、さらに通常の血行再建術の適応がなく内服薬治療のみが適応とされる患者の半年後の下肢切断率が40%であることから¹⁾、骨髄細胞移植治療が下肢延命をもたらした可能性はある。

結 論

骨髄細胞移植治療を施行した患者での下肢切断に

至った症例の分析を行った。TcO₂が30mmHg未満のASO症例では下肢切断の回避は困難であった。しかし、延命効果をもたらす可能性があり、最重症型重症下肢虚血の予後を改善するためにより効率のよい血管再生治療の開発が必要と思われる。

謝 辞

本稿で紹介した重症下肢虚血に対する骨髄単核球移植治療後の予後因子に関する研究内容の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金(平成17年度No.17590714と平成18年度No.18590806)を受けた。

要 約

目 的: 従来法の適応がない重症下肢虚血患者を対象とした骨髄細胞移植治療後の長期予後因子を解析した。骨髄細胞移植治療後の短期観察では有効例が多いが、長期観察では下肢切断例に至った例が少なからず存在する。骨髄細胞移植治療前の患者背景および治療1ヵ月後の短期効果から因子を抽出し、その後の下肢切断をイベントとして解析した。

方法と結果: 対象は2001年12月-2005年3月に骨髄細胞移植治療を施行した21例で平均年齢は60.0±13.6歳であった。対象疾患は閉塞性動脈硬化症(ASO)12例、Buerger病5例、血栓塞栓症3例、好酸球増多症候群1例であった。ASOの12例では非ASOの9例に比べて、高脂血症や糖尿病が多く、移植されたCD34陽性細胞数が少なく、組織酸素分圧(TcO₂)および上肢下肢血圧比が低かった。下肢切断に有意な影響を示した因子は、ASOの診断および術前TcO₂の低値(30mmHg以下)で、実際に下肢切断に至った6例は、すべて術前TcO₂が30mmHg以下のASO例(9例)であった。一方、骨髄細胞移植治療後の短期効果からは、下肢切断の予測はできなかった。

結 論: TcO₂が30mmHg未満のASO患者では下肢切断の回避は困難で、骨髄細胞移植治療はこれらの予後絶対不良群に対して限界があると考えられた。

J Cardiol 2007 Oct; 50(4): 235-242

文 献

- 1) Norgren I, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG; TASC II Working Group: Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease(TASC II). *J Vasc Surg* 2007; **45** (Suppl S): S5-S67
- 2) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T; Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation (TACT) Study Investigators: 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) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schattman G, Isner JM: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; **275**: 964-967
- 4) Ozawa T, Toba K, Kato K, Minagawa S, Saigawa T, Hanawa H, Makiyama Y, Moriyama M, Honma K, Isoda M, Hasegawa G, Naito M, Takahashi M, Aizawa Y: Erythroid cells play essential roles in angiogenesis by bone marrow cell implantation. *J Mol Cell Cardiol* 2006; **40**: 629-638
- 5) Yamashina A, Tomiyama H, Takeda K, Tsuda H, Arai T, Hirose K, Koji Y, Hori S, Yamamoto Y: Validity, reproducibility, and clinical significance of noninvasive brachial-ankle pulse wave velocity measurement. *Hypertens Res* 2002; **25**: 359-364
- 6) Dormandy JA, Rutherford RB: Management of peripheral arterial disease (PAD). TASC Working Group. Trans-Atlantic Inter-Society Consensus (TASC). *J Vasc Surg* 2000; **31** (1 Pt 2): S1-S296

- 7) Saigawa T, Kato K, Ozawa T, Toba K, Makiyama Y, Minagawa S, Hashimoto S, Furukawa T, Nakamura Y, Hanawa H, Kodama M, Yoshimura N, Fujiwara H, Namura O, Sogawa M, Hayashi J, Aizawa Y: Clinical application of bone marrow implantation in patients with arteriosclerosis obliterans, and the association between efficacy and the number of implanted bone marrow cells. *Circ J* 2004; **68**: 1189–1193
- 8) Suzuki H, Iso Y, Kusuyama T, Omori Y, Soda T, Sato T, Shoji M, Koba S, Geshi E, Katagiri T: Neutrophil and erythroblast regulate the effects of bone marrow cell implantation. *Eur J Clin Invest* 2006; **36**: 65–66
- 9) Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL, Hiratzka LF, Murphy WR, Olin JW, Puschett JB, Rosenfield KA, Sacks D, Stanley JC, Taylor LM Jr, White CJ, White J, White RA, Antman EM, Smith SC Jr, Adams CD, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Gibbons RJ, Halperin JL, Hiratzka LF, Hunt SA, Jacobs AK, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B; American Association for Vascular Surgery; Society for Vascular Surgery; Society for Cardiovascular Angiography and Interventions; Society for Vascular Medicine and Biology; Society of Interventional Radiology; ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines; American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; Vascular Disease Foundation: ACC/AHA 2005 guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): Executive summary a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): Endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. *J Am Coll Cardiol* 2006; **47**: 1239–1312