症例報告

重症慢性虚血性心疾患患者に対し逆行性冠静脈経由
による骨髓単核球移植治療が有用であった一例

渡辺 康夫¹⁾ 高山 忠輝¹⁾ 廣 高史¹⁾ 横山真一郎¹⁾
 國本 聡¹⁾ 塩野 元美²⁾ 加藤 実³⁾ 小林寿美子⁴⁾
 和田 美夏⁵⁾ 麦島 秀雄⁵⁾ 齋藤 穎⁶⁾ 平山 篤志¹⁾

¹⁾ 日本大学医学部内科学系循環器内科学分野

²⁾ 日本大学医学部外科学系心臓血管・呼吸器・総合外科学分野

³⁾ 日本大学医学部麻酔科学系麻酔科分野

⁴⁾ 日本大学医学部内科学系血液膠原病内科学分野

⁵⁾ 日本大学医学部小児科学系小児科学分野

⁶⁾ 敬愛病院循環器科

A Three-year Follow Up Case with Severe Ischemic Heart Disease after Retrograde Catheter-based Autologous Bone Marrow Cells Implantation via the Coronary Vein

Yasuo WATANABE¹⁾, Tadateru TAKAYAMA¹⁾, Takafumi HIRO¹⁾, Shinichiro YOKOYAMA¹⁾,
 Satoshi KUNIMOTO¹⁾, Motomi SHIONO²⁾, Jitsu KATO³⁾, Sumiko KOBAYASHI⁴⁾,
 Mika WADA⁵⁾, Hideo MUGISHIMA⁵⁾, Satoshi SAITO⁶⁾ and Atsushi HIRAYAMA¹⁾

¹⁾ Division of Cardiology, Department of Medicine, Nihon University School of Medicine

²⁾ Division of Cardiovascular, Respiratory and General Surgery, Department of Surgery, Nihon University School of Medicine

³⁾ Department of Anesthesiology, Nihon University School of Medicine

⁴⁾ Division of Hematology and Rheumatology, Department of Medicine, Nihon University School of Medicine

⁵⁾ Department of Pediatrics and Child Health, Nihon University School of Medicine

⁶⁾ Department of Cardiology, Keiai Hospital

A 60 year-old male who had undergone four-vessel coronary artery bypass grafting (CABG) due to severe ischemic cardiomyopathy and prior myocardial infarction was admitted to our hospital for implantation of autologous bone marrow cells via a retrograde coronary venous catheter. Myocardial blood flow and ejection fraction were evaluated by stress myocardial scintigraphy four weeks, six months and 36 months after implantation. It was revealed that myocardial perfusion was significantly improved throughout the follow-up period associated with relief of angina pain, but that enhancement of ejection fraction was temporarily observed only at the 6-month follow-up.

Key words: autologous bone marrow cells, coronary vein catheter, cell implantation

自家骨髓細胞，冠静脈カテーテル，細胞移植

(J. Nihon Univ. Med. Ass., 2010; 69 (3): 203–208)

要旨 陳旧性心筋梗塞を有し冠動脈バイパス術の既往を有する通常治療抵抗性の虚血性心筋症患者に対して，自己骨髓単核球を冠静脈内に逆行性オクルージョンバルーンカテーテルを用いて移植した．その4週間後・6ヶ月後・36ヶ月後に負荷心筋シンチグラムならびに左室造影にて，心筋血流・心機能の評価を行い，細胞移植療法の短期・長期の治療効果を観察した．その結果，36ヶ月にわたっての狭心症状ならびに心筋血流の持続的改善と，駆出率の一過性の改善を認めた．

はじめに

虚血性心疾患の対する治療法として，薬物療法・非薬物療法があり，主な非薬物療法には冠動脈バイパス術

(CABG)・冠動脈インターベンション(PCI)がある．しかし，CABGやPCIはすべての患者に対して行えるわけではなく，び慢性の冠動脈病変を有する患者にはしばしば困難な事が多い．このような患者に対しては，従来薬物療法と運動制限を行うことしかできなかった．一方，心筋虚血に対する再生医療の臨床応用として，近年骨髓細胞移植後の血流改善効果が報告されている¹⁾．今回我々は，CABG後重症狭心症を有しCABG・PCIによる追加治療が困難な患者に対し，新しく開発された冠静脈用カテーテルを用いて，骨髓単核球細胞移植療法を合併症なく施行し，比較的長期にわたってその有効性が認められた興味ある一例を経験したので報告する．

I. 症 例

症例は 60 歳男性，1991 年 5 月に陳旧性心筋梗塞を有する多枝病変に対して 4 枝バイパス術（右内胸動脈 対角枝，左内胸動脈 前下行枝（LAD），胃大網動脈 右冠動脈（RCA），大伏在静脈 回旋枝（LCX））が施行されていた．

2005 年 12 月より労作時の息切れ（New York Heart Association: NYHA II 度）を認め，運動負荷心筋シンチ（100 W）を施行し，梗塞部位は下壁領域に，また虚血部位は前壁中隔・下壁・下側壁・前側壁・心尖部領域の広範囲に認められた．2005 年 3 月 13 日心臓カテーテル検査を施行（Fig. 1）し，左前下行枝・回旋枝・右冠動脈は完全閉塞しており，左前下行枝，対角枝，右冠動脈への動脈バイパスグラフトは開通していたが，回旋枝への静脈グラフトは閉塞していた．再度の PCI ならびに CABG は不適であると判断し，内服薬による狭心症状の改善を図ることとなった．2006 年 8 月 NYHA II 度・CCS（Canadian Cardiovascular Society）class III 度の心不全・狭心症状が認められるようになったため運動心筋シンチ（100 W）を施行した．その結果梗塞部位は前壁中隔，下壁，心尖部とさらに拡大しており，虚血部位は下側壁，前側壁領域に認められた．冠動脈造影ではバイパスグラフトの所見に変化はなかった．MRI を施行し回旋枝領域の viability を伴う虚血を認めた．PCI・re-do CABG とともに改めて不適応と判断され，非薬物療法として骨髄単核球細胞移植療法の適応について検討することとなった．

今回の骨髄細胞移植療法は，日大心臓再生医療研究会で検討を行った．本会は 2002 年に循環器内科・心臓血管・呼吸器・総合外科・先端医学系細胞再生部門・麻酔科・血液膠原病内科・小児科・看護部の各分野からのスペシャリストによる検討会として発足したものである．なお本症例に対する細胞再生療法の施行についてはあらかじめ日本大学医学部倫理委員会ならびに日本大学医学部附属板橋病院臨床研究審査委員会において承認を受けている．日大心臓再生医療研究会での検討の結果，細胞再生治療の適応を有すると判断された．また，患者本人ならびに御家族の御希望に基づき，書面による同意を得たのち，細胞移植療法が平成 18 年 11 月 14 日実施された．

まず，手術室にて左側臥位，局所麻酔下にて背側腸骨から 50 ml の骨髄液を採取した．次に Ficoll 溶液に骨髄液を滴下させ，比重遠心分離法にて骨髄単核球細胞を分離し，分離した単核球分画を Phosphate buffered saline（PBS）と混和させ 5 ml に濃縮した．採取細胞数は，骨髄単核球として， 2×10^8 個，CD34 陽性細胞数は， 1.8×10^7 個であった．引き続き，心臓カテーテル検査室にて，逆行性経静脈的に細胞移植細胞をターゲット部位へ低侵襲・高効率・安全にデリバリーすることを目的として新たに開発したダブルバルーン冠静脈カテーテル（Fig. 2）

Fig. 1 Coronary angiograms

The left anterior descending coronary artery (LAD) and the left circumflex coronary artery (LCX) were occluded in their proximal segments.

Fig. 2 Coronary vein catheter.

Fig. 3 Bone marrow cell implantation in AIV (anterior intraventricular vein)

The Catheter for cell implantation was engaged into the ostium of the coronary sinus through the introducer. The guidewire was first advanced into the coronary vein system and crossed to the distal site of AIV. After the guide wire crosses into the end of the AIV, the coronary vein catheter was then inserted into the AIV through the coronary sinus.

（特願番号：PCT/JP03/012917）を用い，右内頸静脈からアプローチし右心房から冠静脈入口部を経て，0.035 インチガイドワイヤーを用い左前室間静脈にそのカテーテ

Fig. 4 Change in CCS classification.

Fig. 5 Change in SPECT score (1, 6, 36 months follow up).

Fig. 6 Change in ejection fraction (by QGS).

ルを進めた。この際冠動脈造影を施行し、目的とする位置に到達していることを確認した。分離した骨髓単核球細胞にヘパリン加生食を加え混和し全体量として 20 ml/に調整したのち、カテーテルのダブルバルーンを拡張し、前室間静脈を閉塞させ、ダブルバルーンの間注入口よりシリンジポンプを用いて閉塞部位よりも中枢側(上流)に向かって 20 分間かけて投与した (Fig. 3)。術中は不整脈や心腔内圧などをモニタリングしたが、心内圧の上昇や ST-T 変化・不整脈の出現も認められなかった。細胞移植後、CCU に入室し経過観察を行った。翌日、症状・心電図・血液検査・心エコー上異常変動のないことを確認し、一般病棟へ転出した。経過は良好で合併症もなく、術後 7 日目に退院となった。

術後 1 ヶ月後・6 ヶ月後・36 ヶ月と胸部症状は CCS 分類 Class III から II へと症状の改善が認められ、外来の経過においても症状の改善が長期間持続していた (Fig. 4)。心筋 SPECT の定性的な血流イメージの結果では、前室間静脈の還流領域以外の下側壁の血流改善を施行前 6 ヶ月後のイメージと比較すると安静時の血流の改善が見られた。運動負荷心筋シンチグラムの定量的な血流スコアで負荷中のスコアで心筋虚血範囲を反映する summed stress score (SSS) について経過を見ても、術前と比較し 1 ヶ月後にすぐに前壁中隔領域で改善を認め、その効果は 6 ヶ月後・36 ヶ月後にわたって継続してした。一方安静時の血流スコアである summed rest score (SRS) は、1 ヶ月後に 2 ポイント改善し、36 ヶ月後スコアには 1 ポイント減少していたものの、本療法施行前に比べて改善効果が続いて認められた。また SSS から SRS を引いた summed difference score (SDS) は、運動負荷による虚血の程度を示す指標で、数値の減少が虚血改善効果を示すが、その SDS は術前から 6 ヶ月後では 2 ポイント増加したが、36 ヶ月後では術前と同じであり有意な変化はなかった (Fig. 5, 7)。Quantitative Gated SPECT (QGS: 心電図同期心筋 SPECT の定量的解析) では、左室拡張末期

Fig. 7 Change in myocardial blood flow after BMI (bone marrow implantation).
Myocardial blood flow at lateral wall area was improved at 6, 36 months after the implantation (arrows).

容量 (EDV ml), 左室収縮末期容量 (ESV ml) から駆出率 (安静時 EF %) を計測し, 1 ヶ月後に EF は一時低下していたが, 6 ヶ月後に EF は 4% 増加していた。しかし, 36 ヶ月後において EF 34.5% と再び低下した (Fig. 6)。また, BNP は治療前 55.9 (pg/ml) であったが, 6 ヶ月後には 42.3 (pg/ml) と改善し, 36 ヶ月後は 54.6 (pg/ml) と推移した。

II. 考 察

我が国の死亡原因は 1 位が悪性新生物, 2 位が虚血性心疾患, 3 位は同じく血管疾患に含まれる脳血管疾患と言われ, 中でも虚血性心疾患における死亡者数は, 毎年約 17 万人とされ, さらに最近では増加傾向にあると言われている。治療法としての心臓バイパス手術やカテーテルによる血管形成術の技術も日々進歩している。しかしながら一方でバイパス手術やカテーテル治療も不可能なほど血管全体が極度に狭小化した治療不応性の患者も近年増加傾向しているのも事実である。最大限の薬物療法によってもコントロール不可能な, しかし他に治療法のない虚血性心筋症の患者にとって, 近年狭心症症状を軽減し心機能を改善させる治療法として, 虚血部位への治療的血管新生を目的とした細胞移植療法やサイトカイン療法が臨床応用されるようになった。骨髄単核球の移植療法はまず下肢動脈硬化症に対して応用され, TACT study において血流の改善が示された¹⁾。また心筋においては開胸による骨髄細胞の直接心筋注入²⁾, 経冠動脈注入³⁾な

どの報告はあるものの, 細胞の生着やデリバリー効果に問題があり, 新しいデリバリーの方法が模索されてきた。心臓再生分野における移植細胞の生着, 細胞移植の効果を評価する方法としては, 基礎研究として心筋の組織標本から CD 陽性細胞数や微小血管数から評価がなされてきた³⁾が, 臨床においては組織標本から評価することは不可能である。そのため, 移植効果の評価方法としては, NYHA・CCS 分類による症状の改善や SPECT・MRI による心筋血流・心機能の評価が用いられている。

Non-fluoroscopic Catheter-based Electromechanically-guided (NOGA) マッピングシステムを用いた経カテーテル自家骨髄単核球細胞移植⁴⁾や, バイパス手術と併用した虚血領域への細胞移植⁵⁾において, 狭心症の症状の軽減, さらに心筋シンチグラムによる心筋血流分布や心機能の改善が報告されている。BALANCE Study によると急性心筋梗塞の患者に対して PCI 後に冠動脈からの自己骨髄単核球細胞移植を実施し, 心室機能の改善や梗塞領域の減少・心血管イベントの抑制効果 (60 ヶ月後) が報告されている⁶⁾。慢性虚血性心疾患に対しては, 冬眠心筋領域への直接的な心筋内投与の有効性が報告されている⁷⁾。

今回我々は経冠静脈的に逆行性に局所投与できる冠静脈カテーテルを使用して骨髄単核球細胞移植を行ったが, この方法では開胸を行わず細胞を心臓局所にデリバリーできること, また手技も簡便であることが他の方法に比較し有利である。また, 骨髄単核球の導入効率の点

からみても、細胞との接触時間や圧力と相関するとの基礎データ⁸⁾から冠静脈カテーテルを用いているために、骨髄単核球と細胞との接触時間を長くすることができ⁹⁾、骨髄単核球が組織内に取り込まれ易いものと推察される。

骨髄単核球細胞移植による血管新生機序としては、移植細胞に含まれる血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell: EPC) による血管形成 (vasculogenesis) と移植細胞による血管新生 (angiogenesis) が主なものであると考えられている。以前は移植細胞に含まれる骨髄由来幹細胞や血管内皮前駆細胞が組織中で分化増殖し、組織修復または血管新生を起こして心機能が改善するとされてきたが、最近ではそれらの前駆細胞や幹細胞を除いた分画を移植しても同様の心機能改善効果があると報告されている⁹⁾。つまり、細胞移植による心機能改善効果のメカニズムは、移植細胞の出すサイトカインにより虚血部周囲に微小血管が増加し心機能が改善する説が最近では支持されている。このような事実から考えると、これからの細胞移植療法はサイトカイン産生能をもつ治療効果の高い細胞の選択が必要とされると考えられる。一方、サイトカイン療法にも多くの問題があり、血管新生に関与するサイトカインは半減期が短く、繰り返し投与が必要であるとされる。本症例では、重症狭心症や虚血性心筋症を有するため多量の骨髄液を採取することが患者の病態の悪化に繋がりがかねないため、局所麻酔下で採取可能な量としては 50 ml が適当であると検討会で判断された。Yokoyama³⁾ のこの冠静脈カテーテルを用いたブタ心筋梗塞モデルによる実験によれば、細胞生着と側副血行路の増加はすでに 1 ヶ月後に認められると報告している。本例においても最初の 1 ヶ月で、心筋シンチにおける SSS, SRS, SDS いずれのスコアにおいても、最初の 1 ヶ月で改善傾向が認められ、さらに 36 ヶ月後においてもの狭心症状の改善の持続ならびにこれらの心筋 SPECT 上のスコアが、多少の変動はあるものの本療法施行前よりも悪化することなく、改善傾向が維持されている。これらの効果は虚血心筋に冠静脈を介して骨髄単核球細胞が取り込まれているためと考えられる。実際に細胞が取り込まれ、生着しているかどうかについては、細胞マーカーなどを使用前後に測定する方法などもあるが現実的ではない。現実には、今回施行することはできなかったが、血管造影などにより冠動脈・側副血行などの評価を行うことは可能であると考えられる。また、本症例においては、心機能を表す EF は 6 ヶ月後に若干の改善をみたものの、36 ヶ月にわたって見た場合には顕著な改善は認められなかった、これが本法の限界であるのか、あるいは本症例自体が元々広汎に梗塞巣を有していたために血管再生した部分が全体として少なかったのか、あるいはデリバリーした細胞数が少なかったのか、原因は明らかではない。また駆出率は、測定時の血圧 (後負荷) や前

負荷の程度にも影響を受けるために、より心筋の収縮能を直接反映する指標で検討する必要があるかもしれない。

今回の骨髄細胞数について、急性心筋梗塞に対する移植細胞数としては、他の報告と大きな差はないが、慢性虚血に対する他の報告では、CD34 陽性細胞数では、平均 $18.2 \pm 3.0 \times 10^6$ であり¹⁰⁾、本症例の 10.0×10^6 と比較し約 2 分の 1 の細胞数であった。したがって、移植細胞数により効果に差が生じることも考えられるが、今後の課題として症例を重ねて検討していく必要があると思われる。

本症例では、定量的に有意な血流改善は認められなかったが、心筋 SPECT の定性的な血流イメージの施行前と施行後 6 ヶ月では、前室間静脈の還流領域以外の下側壁に安静時の血流の改善が見られた。これは、細胞移植を施行した前室間静脈の支配領域以外にも側副血行を介した血流改善であると思われる。しかしながら、定量的な心機能の改善には至っていないことから、移植細胞数による効果の差異が可能性としてあり、さらに骨髄細胞数は年齢、基礎疾患の有無より、個人差が大きく、今回の 50 ml の採取が十分ではなかった可能性があるものの、今後この方法が繰り返し実施可能である利点を活かし克服できる可能性があると思われる。

従来での本例以外の報告はすべて心筋内注入法または冠動脈投与方法であるが、今回我々が用いた経冠状静脈ルートにおいて閉塞させながらの細胞導入は、経冠状動脈投与による末梢塞栓の危険性や心筋内直接投与手術のリスクと比較して、安全にかつ複数回の投与が可能であるという利点があると考えられた。

結 語

慢性虚血性心疾患患者に対し逆行性冠静脈経由に骨髄単核球を移植した。狭心症状の改善は 36 ヶ月間持続していた。6 ヶ月後では一時期若干の心機能の改善を認めたが、36 ヶ月後までのその効果の持続は認められなかった。今後はこの治療方法を確立するため、投与する単核球細胞数や追加実施の必要性などについても考慮し、さらに症例数を積み重ねていく必要がある。

謝辞 今回のプロジェクトにあたり、日大心臓再生医療研究会に参画された日本大学医学部内科学系循環器内科学分野・川野太郎先生、市川 誠先生、石井信朗先生、赤羽正史先生、金井孝司先生、依田俊一先生、敬愛病院・知久正明院長 (付属クリニック)、安藤英之副院長、遠藤正賢医長、日本大学医学部外科学系心臓血管・呼吸器・総合外科分野・瀬在 明講師、秦 光賢講師、南 和友教授、日本大学医学部先端医学系細胞再生移植分野・松本太郎教授、福田 昇教授の諸先生方、日本大学医学部附属板橋病院循環器病棟・手術室・救急救命セ

ンター，ならびに中央放射線棟のスタッフの皆様の御協力に感謝いたします。

文 献

- 1) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al. 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.
- 2) Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003 Jan 4; **361** (9351): 47–49.
- 3) Yokoyama S, Fukuda N, Murohara T et al. A strategy of retrograde injection of bone marrow mononuclear cells into the myocardium for the treatment of ischemic heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 2006 Jan; **40** (1): 24–34. Epub 2005 Nov 4.
- 4) Assmus B, Fischer-Rasokat U, Honold J, et al. TOPCARE-CHD Registry Transcoronary transplantation of functionally competent BMCs is associated with a decrease in natriuretic peptide serum levels and improved survival of patients with chronic postinfarction heart failure: results of the TOPCARE-CHD Registry. *Circ Res* 2007 Apr 27; **100** (8):1234–1241. Epub 2007 Mar 22.
- 5) Schannwell CM. Stem cell therapy for cardiovascular diseases. Experiences in Dusseldorf Dtsch Med Wochenschr. 2008 Dec; **133** Suppl 8: S274–279. Epub 2008 Dec 15. Review. German.
- 6) Yousef M, Schannwell CM, Kosterling M, et al. The BALANCE Study: clinical benefit and long-term outcome after intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009 Jun 16; **53** (24): 2262–2269.
- 7) Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003 May 13; **107** (18): 2294–2302. Epub 2003 Apr 21.
- 8) Thompson CA, Nasser BA, Makower J, et al. Percutaneous transvenous cellular cardiomyoplasty. A novel nonsurgical approach for myocardial cell transplantation. *J Am Coll Cardiol* 2003; **41**: 1964–1971.
- 9) Sanganalmath SK, Stein AB, Guo Y, et al. The beneficial effects of postinfarct cytokine combination therapy are sustained during long-term follow-up. *J Mol Cell Cardiol* 2009 Oct; **47** (4): 528–535. Epub 2009 Jul 16.
- 10) Dedobbeleer C, Blocklet D, Berkenboom G, et al. Myocardial homing and coronary endothelial function after autologous blood CD34+ progenitor cells intracoronary injection in the chronic phase of myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009 Jun; **53** (6): 480–485.