

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591075

研究課題名(和文) 薬剤送達システム徐放化多血小板血漿による血管再生治療

研究課題名(英文) Vascular regenerative medicine based on platelet rich plasma with drug delivery system

研究代表者

高木 元 (Takagi, Gen)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：00301565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：徐放化多血小板血漿の効果を基礎研究で検証後臨床での安全性及び製剤安定性を検証するためのプロトコルを作成した。これには閉鎖環境操作、多血小板血漿作成の自動化、成長因子濃縮効率確認と徐放化技術導入による効果検証を含む。第三種再生医療として厚生労働省へ届け出し、臨床研究開始。まず末梢動脈疾患の新生血管評価を行う方法が未開拓であるため、核医学検査による新生血管の位置、血流及び血管径の評価を可能にし、次に適応疾患として膠原病を合併した動脈硬化症に対する効果を検証し論文発表。現時点で徐放化多血小板血漿による臨床効果は安全面においては有害事象を認めず、その臨床効果を検証するため症例を蓄積中である。

研究成果の概要(英文)：Based on the basic science research regarding control-released platelet rich plasma, clinical protocol confirming safety and bio-formulation stability was made. This protocol including technologies such as closed-environment operation, automatic production system, efficiency of growth factor concentration check, and control-released drug delivery system. Also the protocol was submitted to Ministry of Health, Labour and Welfare as class III regenerative medical technology, and then clinical research was started. First, The radiotracer-based imaging approaches was applied to evaluate blood flow, location and vascular size of angiogenesis and arteriogenesis. Next, the effect of regenerative medicine was evaluated whom had confounding condition such as collagen disease over atherosclerosis. Control-released platelet rich plasma regenerative medicine did not cause adverse event at this point, and then clinical application is continuing.

研究分野：再生医療

キーワード：血小板 末梢動脈疾患 創傷治癒

#### 1. 研究開始当初の背景

近年の我が国における重症末梢動脈疾患(peripheral artery disease; PAD)の罹患率は著しく増加しており、予後も不良であることから、積極的加療が注目されているが、一方病変が進行した場合治療には限界がある。我々は2003年より多くの治療抵抗性(現行の内科的、外科的治療が無効の症例)のPAD症例の診察・治療として、自己骨髄細胞移植による血管再生治療(先進医療承認)の良好な成績を達成している。更に人口の高齢化や難病指定疾患を併発した日本全国からの受診者の必要性に併せ、自己骨髄細胞よりも簡易に施行できる血管再生治療の開発を行っている。その一つとして京都大学再生医科学研究所との共同研究でゼラチンマイクロスフェアによる徐放化DDS(ドラッグデリバリーシステム)による細胞を使用しない製剤化可能な血管再生蛋白治療を考案し、単一成長因子製剤の徐放化に成功。PADに対する安全性と良好な臨床応用効果を証明した(内閣府先端医療開発特区採択課題関連施設)。本研究は、このDDS技術を更に発展させた自己多血小板血漿を用いた複合的サイトカインの徐放化により、低侵襲かつ治療有効性と安全性を保ち、PADへの普及可能な臨床血管再生治療法として立案した。

#### 2. 研究の目的

徐放化多血小板血漿血管再生治療による、末梢動脈疾患(PAD)患者の上下肢虚血症状の改善、潰瘍縮小効果を検証する。

#### 3. 研究の方法

治療群、対象群(一般的内科的治療法)に無作為割りつけを行う。

症例登録:スクリーニングは外来にて施行。

対象:適応は閉塞性動脈硬化症をはじめとする各種疾患による上下肢の虚血性潰瘍により日常生活に支障がある患者。通常治療下で3ヶ月間以上の難治性病態であることを適応基準とする。除外規定は、骨髄炎、多剤耐性菌の感染を伴い、抗生剤での進行抑制が不可能な感染状態。5年以内の悪性腫瘍治療歴や未治療増殖性網膜症の存在に加え、今回の治療による単独加療のみで回復不可能な断端形成術や皮膚移植術が必要な患者とする。多剤耐性菌合併感染症に対しては如何なる血行再建治療も無効な場合が多く除外。

スクリーニング検査:ABI、経皮酸素分圧、皮膚組織灌流圧、MRA、CTアンギオ、RI(Tc)。便潜血、CEA、AFP、CA19-9等の腫瘍スクリーニング検査。炎症反応(CRP、ESR)。

適応判定:適応症例検討委員会において如何なる既存治療も不可能と判断された症例に対して血管再生治療を行う。

エンドポイント:主要評価項目として、プロトコル治療後1年(または中止時)における安静時疼痛または虚血性潰瘍の大きさ。副次評価項目は、有効性として、ABI、Fontaine分類の推移、血管造影上の血管増生の有無、QOLスコア、切断の有無。安全性として、副

作用、重篤な有害事象(死亡、心筋梗塞や脳梗塞などの脳血管疾患発症、癌の発生)とした。

観察期間:治療後4週間、3ヶ月、6ヶ月、1年での(可能な症例は2年まで)フォローアップ検査を施行。

統計学的考察:先行研究である徐放化単一サイトカイン再生治療による疼痛改善効果が4週後92%改善したため、通常加療によるコントロール群の疼痛改善効果が約30%程度と推測。 $\alpha=0.05$ 、検出率80%とし、徐放化多血小板血漿治療群、既存治療群の各群と脱落例を考慮し、各群12例、計24例での検討を行う。

疼痛管理:治療日は疼痛除去の為脊椎、硬膜外か静脈麻酔併用下に、創部筋肉内投与を行う。

調整:成長因子と等電点を調整した生体吸収性ゼラチンマイクロスフェアを使用。滅菌後蛋白の細菌培養検査、エンドトキシン検査で確認を行う。多血小板血漿は患者の自己静脈血液より作成。遠心分離調整後、ゼラチンと混和、結合させ完成させる。手術室内細胞調製室にて作製、投与時に調整する。

用量設定:投与創傷の面積に併せ、 $330\mu\text{l}/\text{kg}$ (総量約20ml)を最大用量とし投与を行う。

投与部位:創部を対象として投与を行う。投与は皮下及び筋肉内投与とする。

投与間隔:繰り返し投与が可能であり、計3回までの治療を可能とする。

投与方法:調整された徐放化多血小板血漿を注射針にて筋肉内に直接投与する。

#### 4. 研究成果

徐放化多血小板血漿の効果を基礎研究で検証し、臨床での安全性及び製剤安定性を検証するプロトコルを作成。閉鎖環境操作、多血小板血漿作成の自動化、成長因子濃縮効率確認と徐放化技術導入による効果検証を盛り込み、第三種再生医療として厚生労働省へ届け出し、臨床研究を開始した。まず末梢動脈疾患の新生血管評価を行う方法が未開拓であり、核医学検査による新生血管の位置、血流及び血管径の評価を可能にし、論文発表を行った。次に適応疾患として膠原病を合併した動脈硬化症に対する効果を検証した。徐放化多血小板血漿による臨床効果は安全面においては有害事象を認めず、臨床効果も症例数を増やし検証中である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

1. Gen Takagi, Masaaki Miyamoto, Yoshimitsu Fukushima, Masahiro Yasutake, Shuhei Tara, Ikuyo Takagi, Naoki Seki, Shinichiro Kumita, Wataru Shimizu. Imaging angiogenesis using  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAA

scintigraphy in patients with peripheral artery disease. J Nucl Med. 57, 192-197. 2016

2. 宮本 正章, 高木 元, 久保田 芳明, 桐木 園子, 手塚 晶人, 太良 修平, 清水 涉, 福嶋 善光, 汲田 伸一郎, 田畑 泰彦. 難治性末梢動脈疾患に対する血管再生治療の最前線. 日本耳鼻咽喉科学会会報 118(11): 1281-1288, 2015
3. Shuhei Tara, Masaaki Miyamoto, Gen Takagi, Akito Tezuka, Sonoko Kirinoki-Ichikawa, Hitoshi Takano, Ikuyo Takagi, Masahiro Yasutake and Kyoichi Mizuno. Low-energy extracorporeal shock wave therapy improves microcirculation blood flow of ischemic limb in patients with peripheral arterial disease. J Nippon Med Sch, 81, 19-27. 2014.
4. Gen Takagi, Masaaki Miyamoto, Shuhei Tara, Sonoko Kirinoki-Ichikawa, Yoshiaki Kubota, Tomohito Hada, Ikuyo Takagi, Kyoichi Mizuno. Therapeutic Vascular Angiogenesis for Intractable Macroangiopathy-related Digital Ulcer in Patients with Systemic Sclerosis: A Pilot Study. Rheumatology (Oxford), 2014, 53(5):854-9.
5. 高木 元, 宮本 正章, 桐木 園子, 久保田 芳明, 手塚 晶人, 清水 涉. 私の病院のフットケア紹介 重症創傷患者の全身ケアとフットケア. 日本フットケア学会雑誌 12; 81-84, 2014
6. 宮本 正章, 久保田 芳明, 桐木 園子, 手塚 晶人, 川中 秀和, 太良 修平, 高木 元, 汲田 伸一郎, 水野 博司, 田畑 泰彦. 治療抵抗性末梢動脈疾患(PAD)に対する血管再生治療. 日本フットケア学会雑誌 12; 1-7, 2014
7. 宮本正章, 高木元. 糖尿病患者の重症下肢虚血に対する血管再生治療 - Limb salvage のためのあらたな戦略. 医学のあゆみ 240(11): 909-916, 2012.

〔学会発表〕(計 41 件)

1. 高木 元, 宮本 正章, 太良 修平, 桐木 園子, 久保田 芳明, 手塚 晶人, 羽田 朋人, 高木 郁代, 清水 涉. 難治性下肢潰瘍に対する組織工学を応用した血管再生治療. 第 14 回日本フットケア学会年次学術集会, 2016. 2月
2. 高木 元, 宮本 正章, 太良 修平, 桐木 園子, 手塚晶人, 久保田芳明, 高木郁代, 羽田朋人, 清水涉. 再生医療と栄養: 閉塞性動脈硬化症における検討. 第 15 回日本再生医療学会総会. 2016. 3月
3. 高木 元, 桐木園子, 日ノ澤進一郎, 杉山末緒, 本城和義, 永積 涉, 杉山理恵, 柿沼香里, 酒井良子, 菅野仁士, 渡邊友

起子, 三原恵理. 動脈硬化疾患の栄養リスクと予後検討 第31回日本静脈経腸栄養学会学術集会. 2016. 2月

4. 高木 元, 宮本 正章, 桐木園子, 久保田芳明, 手塚晶人, 太良修平, 羽田朋人, 高木郁代, 清水 涉. 脈管栄養学とその予後: 閉塞性動脈硬化症における検討. 第 56 回日本脈管学会総会. 2015. 11月
5. 桐木園子, 高木 元, 久保田芳明, 手塚 晶人, 太良 修平, 高木郁代, 清水涉, 宮本 正章. 重症下肢虚血症例における第二種高気圧酸素療法の効果. 第 45 回日本創傷治癒学会. 2015. 11月
6. 高木 元, 桐木 園子, 久保田 芳明, 手塚 晶人, 太良 修平, 高木 郁代, 清水 涉, 宮本 正章. 重症下肢虚血症例における第二種高気圧酸素療法の効果. 第 50 回日本高気圧環境・潜水医学会学術総会. 2015. 11月
7. 桐木 園子, 宮本 正章, 高木 元, 久保田芳明, 手塚 晶人, 清水 涉. 67Ga・citrate SPECT・CT 融合画像評価による骨髄炎の診断および評価法の検討. 第 83 回日本核医学会関東甲信越地方会. 2015. 7月
8. 杉山 理恵, 高木 元, 三原 恵理. NST 活動の最前線 当院の NST 活動報告. 日本外科系連合学会誌 40; 499, 2015. 6月
9. Gen Takagi, Masaaki Miyamoto, Sonoko Kirinoki-Ichikawa, Yoshiaki Kubota, Akito Tezuka, Shuhei Tara, Tomohito Hada, Ikuyo Takagi, Wataru Shimizu. Low Basal Energy Expenditure Regulates Poor Outcome in Patients with Critical Limb Ischemia. Featured Research Session. 第 79 回日本循環器学会学術集会. 2015. 4月
10. 高木 元, 宮本正章, 久保田芳明, 桐木園子, 羽田朋人, 手塚晶人, 乾 恵輔, 高木郁代, 清水 涉. 難治性疾患に対する組織工学を応用した血管再生治療. シンポジウム. 第 13 回 日本再生医療学会総会. 2014年3月
11. 手塚 晶人, 高木 元, 桐木 園子, 久保田 芳明, 塩村 玲子, 小野寺 健太, 宮本 正章, 清水 涉. 創傷治癒への低出力体外衝撃波血管再生療法の可能性. 日本創傷治癒学会プログラム・抄録集 44 回; 72, 2014
12. 松田 範子, 宮本 正章, 内田 英二, 桐木 園子, 高木 元, 小川 令, 福嶋 善光, 汲田 伸一郎, 竹田 晋浩, 徳永 昭. 重症疾患と高気圧酸素治療の拡がり 末梢動脈疾患による難治性潰瘍・壊死治療に対する新たな展開 高気圧酸素療法と骨髄血管再生医療の併用による創傷治癒促進効果. 日本高気圧環境・潜水医学会雑誌 49; 8, 2014
13. 桐木 園子[市川], 宮本 正章, 高木 元, 久保田 芳明, 手塚 晶人, 福嶋 善光,

- 松田 範子, 汲田 伸一郎, 内田 英二, 清水 涉. 67Ga-citrate-SPECT-CT 融合画像評価により骨髄炎に対する高気圧酸素療法効果判定の可能性を示唆した一例. 日本高気圧環境・潜水医学会雑誌 49; 249, 2014
14. 高木 元, 宮本 正章, 久保田 芳明, 桐木 園子, 太良 修平, 手塚 晶人, 羽田 朋人, 高木 郁代, 清水 涉. 難治性血管炎治療の最前線 難治性血管炎・膠原病に対する血管再生治療. 脈管学 54; S130, 2014
15. 久保田 芳明, 高木 元, 宮本 正章, 安武 正弘, 高木 郁代, 太良 修平, 桐木 園子, 手塚 晶人, 羽田 朋人, 古瀬 領人, 清水 涉. 脈管新生血管径の画像評価. 脈管学 54; S119, 2014
16. 芝田 匡史, 栗田 二郎, 宮本 正章, 石井 庸介, 高木 元, 太良 修平, 田畑 泰彦, 新田 隆. PRP 重症虚血肢に対する DDS 徐放化 Platelet-Rich Plasma (PRP) による血管新生療法. 日本美容外科学会会報 36; 153, 2014
17. 高木 元, 宮本 正章, 太良 修平, 桐木 園子, 福嶋善光, 久保田 芳明, 手塚 晶人, 羽田 朋人, 高野 仁司, 高木 郁代, 汲田 伸一郎, 清水 涉. Angiogenesis-Imaging using 99mTc-MAA Scintigraphy in Patients with Peripheral Artery Disease. 第 78 回日本循環器学会学術集会. 2014 年 3 月
18. 高木 元, 宮本 正章, 久保田 芳明, 桐木 園子, 羽田 朋人, 手塚 晶人, 太良 修平, 高木 郁代, 清水 涉. 血管再生治療に必要なエビデンス構築. 第 13 回 日本再生医療学会総会. 2014 年 3 月
19. 宮本 正章, 高木 元, 久保田 芳明, 桐木 園子, 乾 恵輔, 手塚 晶人, 志摩 綾香, 岡 英一郎, 小川 怜, 田畑 泰彦, 清水 涉. 慢性創傷に対する多面的アプローチ 治療抵抗性末梢動脈疾患 (PAD) に対する血管再生治療を応用した集学的先端治療 10 年の長期予後からの考察. 医工学治療 26; 87, 2014
20. 高木 元, 宮本 正章, 安武 正弘, 高木 郁代, 久保田 芳明, 桐木 園子, 水野 杏一. 血管再生医療の 10 年 長期臨床成績から考える治療戦略. シンポジウム. 第 4 回先進医療フォーラム. 2013 年 1 月
21. Gen Takagi, Masaaki Miyamoto, Shuhei Tara, Yoshiaki Kubota, Sonoko Kirinoki, Akito Tezuka, Erito Furuse, Hitoshi Takano, Ikuyo Takagi, Masahiro Yasutake, Kyoichi Mizuno. 10-year Prognosis of Therapeutic Vascular Angiogenesis for Peripheral Artery Disease -Principle Indication and Limitation-. シンポジウム. 第 7 7 回日本循環器学会学術集会. 2013 年 3 月
22. 桐木 園子, 宮本 正章, 高木 元, 久保田 芳明, 手塚 晶人, 福嶋 善光, 杉原 康朗, 汲田 伸一郎, 清水 涉. 67Ga-citrate-SPECT-CT 融合画像評価による新しい半定量的骨髄炎診断法の開発と予後評価. 第 43 回日本創傷治療学会 2013 年 11 月
23. 乾 恵輔, 桐木 園子, 宮本 正章, 高木 元, 久保田 芳明, 手塚 晶人, 清水 涉. 重症下肢虚血への血管再生治療: 10 年長期予後から考える適応と限界. 第 43 回日本創傷治療学会 2013 年 11 月
24. 高木 元, 宮本 正章, 安武 正弘, 高木 郁代, 太良 修平, 久保田 芳明, 桐木 園子, 手塚 晶人, 羽田 朋人, 古瀬 領人, 清水 涉. CLI に対する治療の対策と限界 CLI に対する血管再生治療 10 年長期予後から考える限界点. 日本脈管学会総会 2013 年 9 月
25. 金指 幹元, 宮本 正章, 日下 輝雄, 長野 孝俊, 田畑 泰彦, 五味 一博. ゼラチンハイドロゲル徐放化多血小板血漿の歯周組織再生効果. 特定非営利活動法人日本歯科保存学会学術大会 2013 年 5 月
26. 宮本 正章, 高木 元, 桐木 園子, 久保田 芳明, 村井 綱児, 手塚 晶人, 古瀬 領人, 志摩 綾香, 羽田 朋人, 高木 郁代, 清水 涉. 糖尿病合併治療抵抗性末梢動脈疾患 (PAD) に対する自己骨髄幹細胞による血管再生療法 (先進医療承認) の効果. 糖尿病合併症学会 2013 年 8 月
27. 松田 範子, 宮本 正章, 豊富 達智, 中山 拓也, 志村 亜由香, 佐々木 拓也, 鈴木 健一, 木山 輝郎, 内田 英二, 桐木 園子, 高木 元, 飯村 剛史, 小川 怜, 竹田 晋浩, 徳永 昭. 高気圧酸素治療の将来展望と問題点 高気圧酸素療法と血管再生医療・局所陰圧閉鎖療法併用による難治性下腿潰瘍・足壊疽症例の創傷治療促進効果. ワークショップ. 第 23 回日本臨床工学会. 2013 年 5 月
28. 乾 恵輔, 宮本 正章, 高木 元, 古瀬 領人, 桐木 園子, 久保田 芳明, 清水 涉. 集学的治療が奏功し救肢に成功した難治性糖尿病足壊疽の 1 例. 日本内科学会関東地方会 598 回. 2013 年 7 月
29. 桐木 園子, 久保田 芳明, 高木 元, 宮本 正章, 落 雅美, 栗田 二郎, 飯村 剛史. 末梢動脈疾患に合併した糖尿病性足壊疽に対し, 集学的治療が奏功し救肢した 1 例. 日本内科学会関東地方会 596 回. 2013 年 5 月
30. 久保田 芳明, 高木 元, 桐木 園子, 手塚 晶人, 古瀬 領人, 宮本 正章, 水野 杏一. 糖尿病性虚血潰瘍への血行再建術とその切断回避分析. 第 12 回日本再生医療学会総会. 2013 年 3 月
31. Tomohito Hada, Gen Takagi, Sonoko Kirinoki, Yoshiaki Kubota, Shuhei Tara, Masaaki Miyamoto, Kyoichi Mizuno.

- Therapeutic Vascular Angiogenesis for Intractable Microangiopathy Related Digital Ulcer in Patients with Systemic Sclerosis. 第 77 回日本循環器学会学術集会. 2013 年 3 月
32. 村井綱児、高木 元、手塚晶人、桐木園子、古瀬領人、久保田芳明、宮本正章、水野杏一. 糖尿病性虚血潰瘍での切断回避に関する検討. 第 50 回 日本糖尿病学会関東甲信越地方会. 2013 年 1 月
33. 宮本 正章, 高木 元, 桐木 園子, 久保田 芳明, 水野 博司, 百束 比古, 田畑泰彦. 免疫疾患における再生医学 膠原病・アレルギー疾患による難治性創傷に対する再生医療を応用した先進併用療法 Limb Salvage のための新しい治療戦略. 第 40 回日本臨床免疫学会総会. 2012 年 9 月
34. 高木 元、古山景子、大貫朋子、桐木-市川園子、高瀬仁志、宮本正章. 周術期副反応対策と 予後改善を目指した適応判断. パネルディスカッション. 第 4 回日本創傷外科学会. 2012 年 7 月
35. 栗田二郎、宮本正章、石井庸介、青山純也、高木元、田畑泰彦、落雅美、清水一雄. 外科領域における先端技術・治療の開発 徐放化 Platelet-Rich Plasma (PRP) を用いた血管新生療法の開発. 第 112 回日本外科学会定期学術集会. 2012 年 4 月
36. 羽田 朋人、高木 元、桐木 園子、久保田芳明、太良 修平、宮本 正章、水野 杏一. 強皮症による虚血性指尖潰瘍に対する血管再生医療効果. 第 42 回日本創傷治療学会. 2012 年 12 月
37. 手塚 晶人、高木 元、桐木 園子、古瀬 領人、久保田芳明、宮本 正章、水野 杏一. 糖尿病性虚血潰瘍の切断回避因子分析. 第 42 回日本創傷治療学会. 2012 年 12 月
38. 松田範子、豊富達智、中山拓也、志村亜由香、佐々木拓也、鈴木健一、木山輝郎、内田英二、桐木園子、高木 元、宮本正章、竹田晋浩、徳永昭. 高気圧酸素療法と血管再生医療・局所陰圧閉鎖療法併用による難治性下腿潰瘍・足壊疽症例の創傷治療促進効果. 第 47 回日本高気圧環境・潜水医学会学術集会. 2012 年 11 月
39. 高木 元、宮本 正章、桐木 園子、手塚晶人、久保田 芳明、高木 郁代、水野杏一. 難病疾患による指尖潰瘍に対する再生医療. 第 53 回日本脈管学会総会. 2012 年 10 月
40. 桐木-市川園子、高木 元、太良修平、久保田芳明、安武正弘、高見佳宏、百束比古、栗田二郎、落雅美、水野博司、田畑泰彦、宮本正章、水野杏一. 血管再生医療におけるこの 10 年. 第 18 回日本血管内治療学会総会. 2012 年 7 月
41. Hitoshi Takano, Shuhei Tara, Gen Takagi, Shunichi Nakamura, Koji Murai,

Yukichi Tokita, Shigenobu Inami, Masahiro Yasutake, Masaaki Miyamoto, Kyoichi Mizuno. Hybrid therapy with catheter revascularization and regenerative therapy for critical limb ischemia. 日本心血管インターベンション治療学会誌 4; 478, 2012

〔図書〕(計 1 件)

[分担]高木 元、末梢動脈疾患・静脈疾患・リンパ管疾患: 循環器診療のエビデンスを使いこなす. 154-166. 秀潤社. 2015

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高木 元 (TAKAGI, Gen)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号: 00301565

### (2) 研究分担者

宮本 正章 (MIYAMOTO, Masaaki)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 50229895

### (3) 連携研究者

なし