

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：10107  
 研究種目：基盤研究(C)（一般）  
 研究期間：2016～2019  
 課題番号：16K10647  
 研究課題名（和文）重症虚血肢の潰瘍病変における新たな末梢血流指標の確立と臨床実用化に関する研究  
  
 研究課題名（英文）Study on establishment and clinical application of new peripheral blood flow index in ulcer lesion of severe ischemic limb  
  
 研究代表者  
 赤坂 和美（Akasaka, Kazumi）  
  
 旭川医科大学・医学部・講師  
  
 研究者番号：8034455  
 交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：重症虚血肢の血行再建術後において、術後にスパーブ マイクロバスキュラー イメージング（SMI）と皮膚灌流圧（SPP）による微小循環評価がともに改善し、臨床的にも改善した症例を経験した。しかしながら、SMIによる血流表示は必ずしもSPPと一致しなかった。今後はSMIでより微小な血流を表示可能とすること、SPPと異なるSMIに適した測定部位の検討、解剖学的違いに基づく被検者間格差への対応などが必要と考える。  
 また、潰瘍病変の浸出液に存在するマイクロRNAが、重症虚血肢の潰瘍の病態解明や治療効果の判定などに有用なバイオマーカーとなりうる可能性が示されたが、SMIとの関係については明らかにできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
 末梢動脈疾患患者数は増加の一途であるが、糖尿病や維持透析患者においては、重症化してから専門医へ紹介されるために潰瘍治療の長期化が課題となっている。近年はより低侵襲の治療が可能となったこともあり、SMIの活用による簡便な微小循環の非侵襲的評価と早期診断により下肢切断を避けることは、患者の日常生活動作維持のためにも、国民医療費抑制のためにも重要である。また、潰瘍病変の浸出液のマイクロRNA解析はバイオマーカーとして有用となり、虚血性潰瘍の病態の解明に役立つ可能性がある。患者の負担なく検体の採取が可能であり、高齢者などの虚血性潰瘍の治療戦略をたてる上で有用である。

研究成果の概要（英文）：We experienced clinically improved cases of postoperative revascularization for critical limb ischemia, in which microcirculation evaluation by Superb Micro-vascular Imaging (SMI) and skin perfusion pressure (SPP) both confirmed improvement postoperatively. However, the blood flow display by SMI did not always agree with SPP. In the future, it will be necessary to display weaker blood flow with SMI, examine the measurement site suitable for SMI different from SPP, and cope with the disparity between subjects based on anatomical differences.  
 It was also shown that microRNAs present in the exudates of ischemic ulcer lesions could be useful biomarkers to elucidate the pathophysiology of severe ischemic limb ulcers and to evaluate the validity of ulcer treatments. However, the relationship between microRNAs and SMI could not be clarified and future work is necessary. Elderly friendly testing of SMI and non-invasive sampling for ulcer microRNA are useful modalities in the aging society.

研究分野：循環器内科

キーワード：重症虚血肢 微小循環評価 末梢血流 皮膚潰瘍 マイクロRNA

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 末梢動脈疾患患者の増加と早期診断の必要性

症候性の末梢動脈疾患患者数は国内に40万人前後、無症候性のものを含めると50~80万人前後と推測されており、高齢化と動脈硬化性疾患の増加から患者数はさらに増加すると予想される。また、糖尿病や維持透析患者においては間歇性跛行を呈さずに皮膚潰瘍に至る患者も多く、末梢動脈疾患の診断が難しくなっている。虚血以外の原因により皮膚潰瘍を形成する場合も多い糖尿病患者では、重症化してから専門医へ紹介されるために潰瘍治癒の長期化が課題となっている。近年はより侵襲度の小さい血管内治療などが行われるようになり、高齢者や合併症を有する患者に対する治療の幅が広がった。より早期に診断し、血行再建術を至適時期に施行することで下肢切断を避けることは、患者日常生活動作のためにも、国民医療費抑制のためにも重要である。

### (2) 簡便で非侵襲的な微小循環検査法の開発の必要性

血行再建術が必要な患者をより早期の段階で診断、治療することは喫緊の課題であるが、日常診療における簡便な下肢の微小循環評価法は普及していない。末梢動脈疾患の非侵襲的検査法として普及している血圧脈波検査による足関節上腕血圧比 (Ankle brachial pressure index; ABI) は、足の血圧低下により血流低下を評価する方法であるが、動脈の閉塞性病変の評価であって微小循環評価には至らず、透析患者や糖尿病患者においては動脈の石灰化により正確に測定できないことが多い。また、微小循環の非侵襲的検査法である皮膚灌流圧 (skin perfusion pressure; SPP) は創傷治癒の可能性評価に用いられる<sup>1)</sup>が、測定の煩雑さと30分程度の検査時間を要することから足関節上腕血圧比 (ABI) ほど普及していない。また、SPPは潰瘍病変の広がりによっては測定困難な場合もある。近年開発された超音波新技術であるスパーブ マイクロバスキュラー イメージング (Superb Micro-vascular Imaging; SMI) はベッドサイドでリアルタイムの微細血流評価を可能とし、低流速血流検出能に優れる SMI は虫垂炎での血流増加や、乳腺腫瘍での微小循環評価<sup>2)</sup>などが報告されているが、末梢動脈疾患での応用はなされていない。

### (3) 潰瘍治癒と生体シグナル伝達

皮膚潰瘍の治癒過程において、血管新生、炎症、細胞外基質のターンオーバーの過程を担う生体シグナル伝達が重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。重症虚血肢の血行再建後の潰瘍治癒過程において、潰瘍浸出液のマイクロ RNA および蛋白質が変化している可能性があり、治療戦略に役立てることができるかもしれない。

## 2. 研究の目的

本研究では SMI が重症虚血肢における簡便な微小循環評価となりうるか検討する。さらには、潰瘍治癒促進との関係を調べることで、疼痛を伴う高齢者に優しい診断法として活かす可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

重症虚血肢の治療を目的に当院血管外科に入院した患者5名 (43~85歳、男性3名) を対象とした。(倫理委員会承認番号 16182)

### (1) 血行再建術前後における SMI の評価

SMIにより、虚血肢とりわけ虚血部の微小循環を血行再建術前後にて評価し、SPPと比較

した。SMI と SPP は患肢の足底内側と足底外側において各々評価した。使用装置は SMI に関して TOSHIBA 社製 Xario200 とキヤノンメディカルシステムズ (株) 社製 Aplio 500, 中心周波数 12MHz のリニア型探触子を用い, SPP の測定には KANEKA PAD3000 を用いた。術前に SPP 評価ができなかった例が 1 例 1 部位あった。術後の評価は 2 週間後に施行したが, 創部の状態により調整した。

(2) 潰瘍治癒過程における生体シグナル伝達の評価

潰瘍病変合併例において, 浸出液を吸収したガーゼを回収した。ガーゼ各半分を遠心して浸出液を得て, miRNeasy を使用して RNA を回収した。回収した RNA を逆転写へ使用し, cDNA をデジタル PCR にて解析することでバイオマーカーを評価した。

(3) 健常者における SMI の再現性

TOSHIBA 社製 Xario200 にて健常者 5 例における描出について確認した。キヤノンメディカルシステムズ (株) 社製 Aplio 500 は, SMI モードで取得した画像に対して ROI 内部のカラー表示のピクセル数, 面積, 割合を表示する機能を搭載しており, 定量評価が可能となった。この Vascularity Index (VI) を用いた定量評価により, 再現性を確認した。

4. 研究成果

(1) 血行再建術前後における SMI の評価

①結果

SPP は術前  $17.4 \pm 4.1$  mmHg から  $38.0 \pm 4.2$  mmHg へ有意に上昇していた ( $p < 0.05$ ) (図 1)。SMI 画像では 2 例 3 部位において, 術前に比して術後の血流増加が明らかであった (図 2)。しかしながら, 3 例 7 部位においては血流増加が明らかではなく, SPP 値と SMI での血流表示には乖離も認められた (図 3, 4)

図 1 術前後の SPP

赤：SMI での血流増加部位  
青：SMI で変化が得られなかった部位

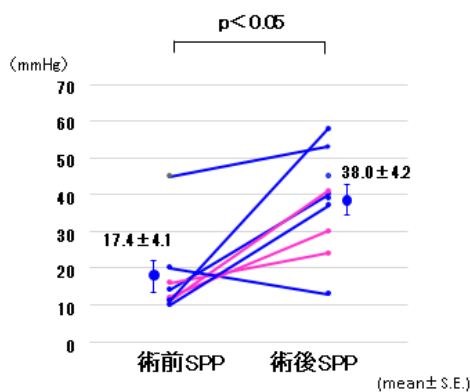


図 2 症例 1 の SPP と SMI

SMI での血流表示も SPP も術後に増加した。

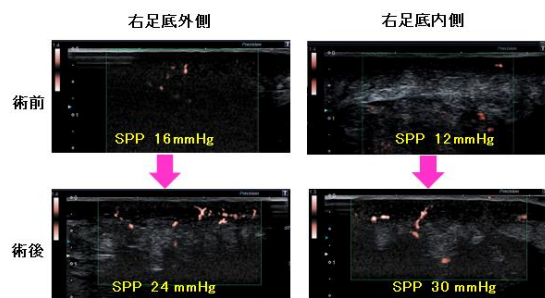


図 3 症例 2 の SPP と SMI

足底内側 (右側の図) では SPP 増加に比し, SMI 画像での改善が得られていない。

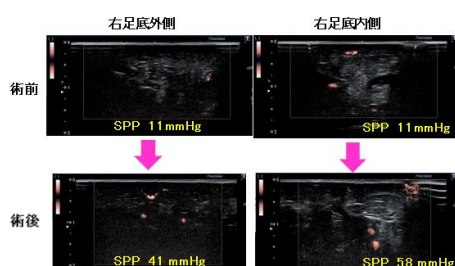
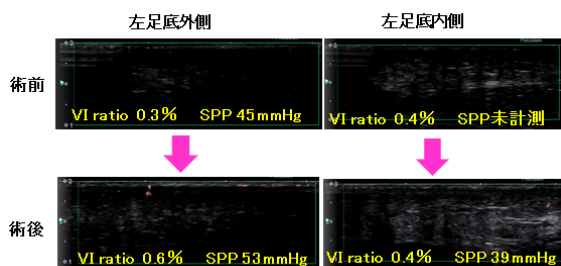


図 4 症例 3 の SPP と SMI

SMI での血流表示は術前後ともに乏しいが, SPP 値は得られている。



微小循環評価の黄金律として用いられている SPP は加圧を必要とするため、疼痛を伴う重症虚血肢を有する患者において、簡便に施行できる SMI による微小循環評価が期待された。しかしながら、術後の SPP 改善が高率であるのに比して、SMI での血流増加が確認できた部位は半数以下であった。さらには SMI での血流と SPP 値との間には乖離も認められたことから、SPP 値が十分高値であれば SMI 画像で血流改善が確認できることが期待できると限らないことが考えられた。SMI 画像での血流改善が確認しにくい理由としては、SPP との比較のために、SPP と同一の部位での評価を試みたが、虚血とその改善を SMI にて評価するには足底は角層が厚いために不適切であった可能性が考えられた。

また、臨床的に活用するためには、SMI 画像での血流を定量的に評価することが望まれた。画像解析の方法を模索している間に、定量評価できる機種が販売され、定量評価にて再現性を確認することとした。

## (2) 潰瘍治癒過程における生体シグナル伝達の評価

### ①結果

潰瘍病変 1 例（症例 3）において術前後で浸出液を得た。RNA 濃度は各 3ng/ $\mu$ l 程度であった。miR-133b は血行再建術前 7.13 copies/ $\mu$ l から術後 3 週間で 2.25 copies/ $\mu$ l へ減少、miR-30e は術前 0.67 copies/ $\mu$ l から術後 1.3 copies/ $\mu$ l に増加、miR-622 は術前 2.99 copies/ $\mu$ l から術後 0.81 copies/ $\mu$ l に減少した。

### ②考察

miR-133b, miR-30e, miR-622 はいずれもがん抑制遺伝子として報告されている。1 症例であるものの、術前と術後 3 週間では miR-133b, miR-30e, miR-622 いずれも著明な変化をきたしていた。したがってこれらのマイクロ RNA は重症虚血肢の潰瘍病変の発症、進展などの病態と深く関連している可能性がある。浸出液にはマイクロ RNA が存在し、デジタル PCR にて解析可能なことより、重症虚血肢の潰瘍の病態解明や治療効果の判定などに有用なバイオマーカーとなりうる可能性が示された。また、症例 3 の SPP は術前から比較的高値であり、SMI 表示は術前後とも乏しい症例であった。マイクロ RNA は血流指標とは違う機序で潰瘍治癒に関与していると考えられた。

## (3) 健常者における SMI の再現性

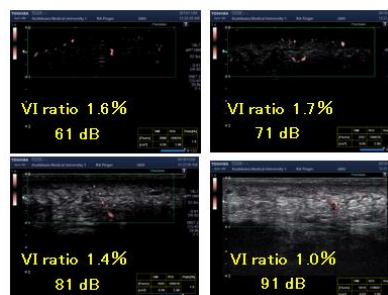
### ①結果

TOSHIBA 社製 Xario200 による健常者 5 例の足底の SMI は、研究開始前に評価した被検者に比して血流表示が乏しい印象があり、また、個人差も認められた。

B mode gain によって SMI 表示に差が認められた（図 5）。

図 5 同一被検者における表示の差異

B mode gain による SMI 表示の差異が認められる。



VI を用いた定量評価を、条件を変えて 6 回施行し、Tukey-Kramer 検定と paired T test にて評価した (図 6, 7)。B mode gain と使用探触子による差異が認められた。

図 6

B mode gain が SMI 表示に与える影響  
同一検者・同一被検者での測定

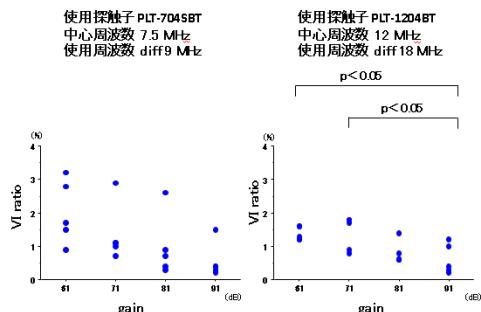
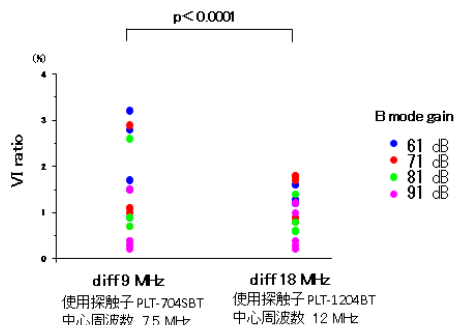


図 7

使用探触子が SMI 表示に与える影響  
同一検者・同一被検者での測定



## ②考察

SMI は血流表示であるために B mode gain 設定により影響を受けることは推測されたことであるが、足底の SMI 表示が微弱であり、VI 値が小さいためにさらに影響を受けやすいと考えられた。SMI 表示を最大限とするために SMI の周波数は最大としていたが、健常人の微小循環においても B mode gain 設定や使用探触子は SMI 表示に影響を与えた。

## 5. まとめ

SMI による重症虚血肢の微小循環の簡便な評価が期待され、術後に SMI と SPP がともに改善し、臨床的にも重症虚血肢が改善した症例を経験した。しかしながら、SMI による血流表示は必ずしも SPP と一致しなかった。SPP と同一部位での評価を行うために足底での SMI 評価を行ったが、SMI による血流表示がごく軽微であったことは SMI 評価を困難にする一因と考えられた。今後は SMI で微小循環をより表示可能とすること、SPP と異なる SMI に適した測定部位の検討、解剖学的違いに基づく被検者間格差への対応、B mode gain など適切な装置設定、微小循環ながら動脈拍動を考慮した心電図同期の検討などが必要と考える。

潰瘍病変の浸出液に存在するマイクロ RNA が、重症虚血肢の潰瘍の病態解明や治療効果の判定などに有用なバイオマーカーとなりうる可能性が示されたが、今回症例が集められず、末梢血流指標との関係を明らかにできなかった。今後重症虚血肢の潰瘍病変にて症例を重ね、マイクロ RNA と末梢血流指標との関係を明らかにしていきたい。

## <引用文献>

- 1) 「日本循環器学会. 循環器病ガイドラインシリーズ 2015 年版: 末梢閉塞性動脈疾患の治療ガイドライン(2015 年改訂版) [http://www.j-circ.or.jp/guideline/pdf/JCS2015\\_miyata\\_h.pdf](http://www.j-circ.or.jp/guideline/pdf/JCS2015_miyata_h.pdf) (2020 年 6 月閲覧)
- 2) Park AY, Seo BK. Ultrasonography. Up-to-date Doppler techniques for breast tumor vascularity: superb microvascular imaging and contrast-enhanced ultrasound. 2018. 37(2): 98-106.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ito K, Ito E, Saito K, Tomoda Y, Akasaka K, Fujii S.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Measurements of brachial artery cross-sectional vascular area and volume elastic modulus using automated oscillometric measurements: reproducibility between examiners and intra-rater reliability.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Rinsho Byori	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 赤坂和美、河端奈穂子、東 信良、藤井 聡
2. 発表標題 重症虚血肢における超音波による低流速血流評価の可能性
3. 学会等名 第66回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 赤坂和美、河端奈穂子、東 信良、藤井 聡
2. 発表標題 重症虚血肢における超音波による低流速血流評価の可能性
3. 学会等名 第66回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田弥代、赤坂和美、長多真美、中森理江、伊藤栄祐、斉藤久美子、河端奈穂子、齋藤江里香、佐渡正敏、谷野美智枝、中西仙太郎、紙谷寛之、藤井 聡
2. 発表標題 急速に進行したパンヌスによる僧帽弁位生体弁機能不全の1例
3. 学会等名 日本心エコー学会 第30回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長多真美、赤坂和美、池田弥代、中森理江、河端奈穂子、斎藤江里香、佐渡正敏、藤井 聡、和田 始、東 信良
2. 発表標題 頸動脈超音波検査を用いたステント留置術後のステント内突出物の経時的評価
3. 学会等名 第60回日本脈管学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長多真美、赤坂和美、中森理江、河端奈穂子、齊藤江里香、佐渡正敏、簗島暁帆、竹内利治、長谷部直幸、藤井 聡 .
2. 発表標題 心房中隔欠損症に皮膚筋炎関連間質性肺炎による肺高血圧症を合併した1例 .
3. 学会等名 日本心エコー図学会第31回学術集会 .
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齊藤江里香、赤坂和美、長多真美、中森理江、河端奈穂子、佐渡正敏、藤井聡
2. 発表標題 心不全症状にて発見された下大静脈へ穿破した右総腸骨動脈瘤の1例
3. 学会等名 日本超音波医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Satoshi Fujii, Kazumi Akasaka, Kenji Takahashi
2. 発表標題 Low Levels of Circulating Extracellular Vesicle-Encapsulated HULC Are Associated with Left Ventricular Hypertrophy in Japanese
3. 学会等名 XXVIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	藤井 聡  (Fujii Satoshi)  (90291228)	旭川医科大学・医学部・教授    (10107)	