

## 審査の結果の要旨

氏名 石井 誠之

近年、動脈硬化性疾患が増加するに伴い、下肢切断の危険を有する重症下肢虚血症例も増加している。慢性重症虚血肢においては薬物治療では十分な効果が得られないことも多く、また、外科的手技やグラフトの進歩にもかかわらず、外科的血行再建が困難な症例もしばしば見受けられる。東京大学血管外科は、2001年慢性重症虚血肢に対して *ex vivo* 法を用いた新たな遺伝子導入の方法を提示した。インターロイキン 2 の分泌シグナルを挿入した組換え塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor: bFGF) 遺伝子をアデノウイルスベクターによりウサギ自家線維芽細胞に *ex vivo* で導入し、ウサギ下肢慢性虚血モデルの虚血側内腸骨動脈に経カテーテル的に投与したところ、虚血肢において新生血管の発達が確認された。しかし、良好な側副血行路の発達と安全性を両立させる最適な細胞投与数についてと、この方法が複数回施行できるかについてはいまだに明らかではない。本研究は *ex vivo* 法を用いた遺伝子導入法を応用するために、投与する細胞数を様々に変化させて上記の方法を施行し、血管新生と安全性を両立させる至適投与細胞数について検討し、また細胞投与を複数回施行しその効果について検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. 様々な数のウイルス導入細胞 ( $2 \times 10^5$  個、 $1 \times 10^6$  個、 $5 \times 10^6$  個、 $2.5 \times 10^7$  個) または Vehicle 投与 28 日後において、 $5 \times 10^6$  群と  $2.5 \times 10^7$  群が他の 3 群よりウサギ虚血肢に良好な血管新生を認めたが、 $5 \times 10^6$  群と  $2.5 \times 10^7$  群の間では差を認めなかった。また  $2 \times 10^5$  群と  $1 \times 10^6$  群は対照の Vehicle 群と差を認めなかった。以上より、 $1 \times 10^6$  個以下のウイルス導入細胞の投与では、この系においては有効

な側副血行路の発達と組織還流の増加を得られないことが示された。また  $5 \times 10^6$  個より多くの細胞を投与しても、血管新生はそれ以上増加しないと考えられた。

2.  $5 \times 10^6$  個と  $2.5 \times 10^7$  個の細胞投与 28 日後までに、血清 bFGF 濃度の上昇を認めず、また明らかな全身合併症は認めなかった。投与細胞数を  $5 \times 10^6$  個より増加させても、虚血肢に分布する細胞数は一定であり余剰の細胞は主に肺に蓄積することが示されたが、明らかな肺合併症は認めなかった。 $2.5 \times 10^7$  個の細胞投与後には血中アデノウイルス抗体価は有意に高値を示した。 $2.5 \times 10^7$  個の細胞投与直後に虚血肢の血圧が一過性に低下する例を認め、大量の細胞投与は塞栓の危険性があることが示唆された。1 と併せ、この系においては血管新生と安全性を両立させる至適投与細胞数は  $5 \times 10^6$  個と考えられた。

3. アデノウイルスベクターを用いてルシフェラーゼ遺伝子を導入したウサギ自家線維芽細胞を 3 週間の間隔を空けて同様の方法で 2 回投与したところ、対照群では、虚血肢筋肉に著明なルシフェラーゼ蛋白の発現を認めたが、反復投与群では、第 2 回投与後ルシフェラーゼの発現はほとんど認められず、3 週間の間隔ではこの方法は繰り返し施行することはできないと考えられた。

以上、本論文は ex vivo 法を用いて bFGF 遺伝子が導入されたウサギ自家線維芽細胞をウサギ下肢慢性虚血モデルの虚血側内腸骨動脈に投与するにおいて、側副血行路を十分に発達させ、また副作用を最小限にするのに適した細胞投与数は  $5 \times 10^6$  個であることを示した。本研究は、これまで治療の困難であった外科的血行再建が不可能な慢性重症虚血肢に対する、新しい治療法の応用に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。