

機能的足場に rhbFGF を組み込んだ  
人工臓器・生体材料への血管新生と組織再構築

(課題番号 16500304)

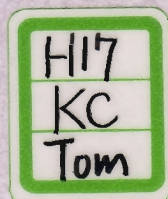
平成16, 17年度科学研究費補助金 (基盤研究C)  
研究成果報告書



平成18年3月

研究代表者 富澤 康子

(東京女子医科大学心臓血管外科学講座 助手)



機能的足場にrhbFGFを組み込んだ  
人工臓器・生体材料への血管新生と組織再構築

(課題番号 16500304)

平成16, 17年度科学研究費補助金 (基盤研究C)  
研究成果報告書

平成18年3月

研究代表者 富澤康子

(東京女子医科大学心臓血管外科学講座 助手)



## 目次

はしがき	1
1. 研究課題名・研究組織・研究経費・研究発表	3
2. 研究成果	
1. この度の研究計画及び成果の概要	5
2. 血管新生と組織再構築に関係する足場と血管新生因子	9
3. A single local application of recombinant human basic fibroblast growth factor accelerates initial angiogenesis during wound healing in rabbit ear chamber	21
3. 参考論文	
1. 人工血管-この1年の動き	27
2. Clinical benefits and risk analysis of topical hemostats: A review	45
3. 局所止血材の細胞毒性と組織親和性のin vitroおよびin vivo評価	61
4. 綿状コラーゲン製止血材の吸血性、止血性及び純度の評価	77
5. 局所止血材料により冠動脈バイパスグラフトに狭窄を来したと思われる 1 症例	81
6. Deterioration of Suture Materials at Prosthetic-Host Anastomoses	85
7. Endothelialization and Functional Neointima on Vascular Grafts in Human	89
8. Bilateral versus unilateral internal mammary revascularization in patients with diabetes	91
9. Survival benefit of exclusive use of in situ arterial conduits over combined use of arterial and vein grafts for multiple coronary artery bypass grafting	99
10. Transurethral Ethanol Injection Therapy for Prostatic Hyperplasia: 3-Year Results	105

## はしがき

東京女子医科大学心臓血管外科学 富澤康子

奈良斑鳩の法隆寺西院伽藍の回廊内にはいると、突然、聖徳太子の時代にタイムスリップする。そこには世界最古の木造建築の金堂と五重塔が建ち、薄暗い金堂の中には飛鳥時代からの釈迦三尊像や薬師如来像がおられる。木造建築の法隆寺が修理されてはきたものの、1300年間にわたってその姿をとどめてきたことは奇跡に近い。

法隆寺再建非再建論争が始まったのは明治38年（西暦1905年）2月のことで、2005年はちょうど100年目にあたる。「日本書紀」天智天皇9年4月30日条の記述が正しければ、法隆寺は天智9年（670年）4月30日の夜半に全焼し、現在ある法隆寺はその後再建されたことになる。この「日本書紀」の記述を否定したのが法隆寺非再建説である。しかし、創建法隆寺であったと考えられる若草伽藍の発掘調査結果から、現在では再建説が優位にある。

法隆寺に関係した書物を読むと、歴史学・建築史学・美術史学・考古学を含む歴史系人文科学が一体となって学術研究を進歩させてきたのがわかる。しかし、これだけ研究されていても未だに法隆寺が何時頃着工し、何時完成したかの正確な年代さえも明かになっていないのに驚く。自然科学の1種である年輪年代学を用いて法隆寺心柱の年輪を計測し、伐採年を割り出し、科学的根拠に基づいて創建年代がつきとめられるはずである。法隆寺の心柱年輪計測は1952年に西岡秀雄先生が日本考古学協会第10回総会で発表し、それから50年以上経過している。しかし、年輪年代学が自然科学分野の学問であるにもかかわらず、現在の法隆寺心柱研究には考古学的要素が多く含まれてしまい、科学分野の考え方が重んじられていないのを私は残念に思う。

前回の報告書の「はしがき」に100年前のAlexis Carrel博士の行った組織工学研究に関して思っていることを述べた。科学はevidenceを尊重し、再現実験により検証が可能な学問である。人文科学とは大きく違うことを本研究を遂行中に再認識した。



1. 研究課題名：研究組織・研究経費・研究発表

【研究課題名】

機能的足場に rhbFGF を組み込んだ人工臓器・生体材料への血管新生と組織再構築

研究課題番号 16500304

【研究組織】

研究代表者 富澤康子（東京女子医科大学心臓血管外科助手）

【研究経費】

平成 16 年度 2,200 千円

平成 17 年度 1,400 千円

計 3,600 千円

【研究発表】

本（編集、分担執筆）

1. 人工臓器 第20回教育セミナー 編者:富澤康子 発行:日本人工臓器学会、2004年7月、Pp.1-81, 東京
2. 人工臓器 第21回教育セミナー 編者:富澤康子 発行:日本人工臓器学会、2005年7月、Pp.1-153, 東京
3. 富澤康子. 人工血管開発の課題と展望. In: 許俊鋭, 斉藤明, 赤池敏宏, eds. 人工臓器・再生医療の最先端. 先端医療シリーズ 37. 東京: 先端医療技術研究所; 2005:122-125.
4. 富澤康子:【column】A well-known aortic surgeon-Scholarly achievements D. Craig Miller、高本眞一監修 心臓外科 Knack & Pitfalls 大動脈外科の要点と盲点、文光堂 東京 2005年3月、p82

学術論文（学会雑誌・学術雑誌）

1. Tomizawa Y. Clinical benefits and risk analysis of topical hemostats: a review. J Artif Organs 2005; 8:137-42.
2. Tomizawa Y, Aomi S. Deterioration of suture materials at prosthetic-host anastomoses. J Artif Organs 2004; 7:207-209.
3. Tomizawa Y. Endothelialization and functional neointima on vascular grafts in humans. Ann Thorac Surg 2005; 79:1465.
4. Nishida H, Tomizawa Y, Endo M, Kurosawa H. Survival benefit of exclusive use of in situ arterial conduits over combined use of arterial and vein grafts for multiple coronary artery bypass grafting. Circulation 2005; 112:I299-303.
5. Komori M, Tomizawa Y, Takada K, Ozaki M. A single local application of recombinant human basic fibroblast growth factor accelerates initial angiogenesis during wound healing in rabbit ear chamber. Anesth Analg 2005; 100:830-4.
6. Komori M, Takada K, Tomizawa Y, Uezono S, Nishiyama K, Ozaki M. Effects of Colloid Resuscitation on Peripheral Microcirculation, Hemodynamics, and Colloidal Osmotic Pressure During Acute Severe Hemorrhage in Rabbits. Shock 2005; 23:377-382.
7. Goya N, Ishikawa N, Ito F, Kobayashi C, Tomizawa Y, Toma H. Transurethral Ethanol Injection Therapy for Prostatic Hyperplasia: 3-Year Results. J Urol 2004; 172:1017-1020.

8. Sato M, Endo M, Tomizawa Y, Nishida H. Left ventricular true aneurysm with pseudoaneurysm detected five years and nine months following repair for oozing type free wall rupture. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 53:147-9.
9. 富澤康子、小森万希子、高田勝美、西田博、遠藤真弘、黒澤博身:局所止血材の細胞毒性と組織親和性の *in vitro* および *in vivo* 評価、*日心血外会誌*、33:382-386, 2004
10. 富澤康子:糖尿病合併症例における冠血行再建術、*循環器専門医*、12:295-300, 2004
11. 富澤康子:人工血管-この1年の動き、*人工臓器*、33:191-7, 2004
12. 富澤康子:医師と技士の教育と連携はどうあるべきか、特集「体外循環」、*人工臓器*、34(3):in press, 2005
13. 西田博、黒澤博身、遠藤真弘、富澤康子:包括医療(DPC)からみた術式の選択-疾患別 IVR vs. 手術の比較- ケース 2:冠動脈疾患の治療、*インナービジョン*、20:19-23, 2005
14. 高田勝美、小森万希子、能登谷敦子、尾崎真、富澤康子: Effects of Ulinastatin on Microcirculation during excessive hemorrhage using fluid therapy, *Surgical Trauma & Immunological Responses*, 14: 84, 2005
15. 宮川-富田幸子、今中-吉田恭子、杉村洋子、富澤康子、中澤誠:冠動脈の発生と発達に関する最近の知見、*冠疾患学会雑誌*、10:55-60、2004
16. 岩崎淳一、宮川-富田幸子、森善樹、富松宏文、中澤誠、富澤康子、遠藤真弘、小久保博樹:マウスの心電図計測方法-生後5日目の baby から adult まで、呼吸と循環、52:203-206, 2004

## その他

1. 富澤康子:【巻頭言】人工臓器は開発の時代から使用時の安全をより考える時代に、*人工臓器*、34(3):in press, 2005

## この度の研究計画及び成果の概要

東京女子医科大学心臓血管外科 富澤康子

### はじめに

ここでは本研究の全貌の大まかな理解のために、研究計画および成果のエッセンスを簡単に説明する。同時にこの研究を始めるにあたっての背景、社会的意義や位置づけについても明らかにしておきたい。そうすることによって、この研究の意義および成果の意味を浮き彫りにすることができ、また、この研究により導かれた論文、さらに我々の参考論文を読むに際して、一層深い理解が得られると思われる。

### 研究の背景および目的

外傷や疾患により組織が損傷を受けた場合、体内では治癒、すなわち再生現象が起きる。失われた組織や臓器を再生させるためには、細胞、細胞が活発に増殖できる環境（足場）、そして増殖因子が不可欠であるが、特に細胞増殖が足場に依存しているため、その選択は重要である。

血管壁再構築のためには天然高分子であるコラーゲン、合成高分子であるグリコール酸、乳酸系高分子などが、また骨再生には無機物質であるヒドロキシアパタイトが用いられてきた。再生医療には臓器移植に伴うドナー不足の問題はなく、人工臓器を植え込むわけでもないため、より社会的に受け入れられやすい医療である。自然には再生しない/できない組織を患者自身のあるいは同種の細胞を増殖させて利用することにより再生させる目標、さらに機能を回復させるのが再生医学であり、その臨床応用にかかる期待はきわめて大きい。

本研究の目的は損傷を受けた生体組織や臓器を人工臓器や移植に頼らず組織再構築するために、細胞・細胞が活発に増殖できる環境(足場)・増殖因子の3要素の至適条件を求

める。さらに組織再構築に伴う血管新生では血管内皮前駆細胞が関係して血管芽(sprouts)が形成されるが、この血管内皮前駆細胞の血管再生医療への可能性を検討したいと思った。具体的には使用する足場(scaffold)に増殖因子を積極的に組み込むことにより天然の細胞外マトリックスに近いインテリジェント細胞外環境の設計を目指した。

細胞・細胞外マトリックス・サイトカインがすべて存在し好ましくなければ治癒は促進しない。生体における細胞外マトリックスは、多細胞生物を構成する細胞外環境因子であり増殖及び分化の制御を行う。そのため、初期における足場は細胞外マトリックスの役割をするが、生体内での役割終了後には吸収され、再び取り出す必要が無く、しかも材料の存在が生体組織・臓器の再生を妨げないことが好ましい。足場にリコンビナント hbFGF を一時的あるいは徐放するように、または内因性サイトカインが吸着するように使用することを期待した。現在、市販の bFGF は褥創・皮膚潰瘍治療剤として臨床で使用されており、細胞増殖に伴って著明な新生血管の侵入が期待されている。

この研究は自己再生能を活性化する組織工学を目指しており、新しい治療法を作り出すのに大いに貢献するものと考えた。またこの研究は、苦しんでいる難治性治癒不全の治療に貢献し、患者の苦痛を軽減することが可能になると考えた。組織再構築および血管新生を促進する条件を明らかにすることを計画した。

### 学術的な特色、独創的な点及び予想される結果と意義

①細胞外マトリックスに増殖因子を組み込



み至適のインテリジェント細胞外環境の設計を試みた。②細胞外環境として細胞親和性の良好な、生体吸収性材料の繊維状アテロコラーゲンを足場(scaffold)とした。③細胞増殖促進作用を持つリコンビナント *rhbFGF* を一時的または徐放性に、あるいは足場に内因性サイトカインが吸着するように利用した。徐放には足場のアテロコラーゲンを DDS として利用した。④組織再構築の経過中には血管新生の客観的な評価が重要であり、REC モデルでは非侵襲的に直視下経時的リアルタイムに新生血管の伸展速度が測定可能であることを利用した。

臨床においてこの領域の研究には興味を持たれている。最先端の学問である組織工学の評価にオーソドックスな透明窓モデルを採用した。現代科学の強力な武器であるリコンビナント製品を用いたことにより興味深いものとなることが予想された。過去からの知識および技術を利用しつつ、発想を転換し、独創的な手法を用いて、この課題を克服することを期待した。

## 国内外の関連する研究の中での当該研究の位置づけ

組織工学は生命科学と工学にまたがる分野として 1993 年に確立され、新しい治療コンセプトとして期待されている。現在の再生医学では、(1)個体(クローン)、(2)臓器、(3)組織の3つのレベルに分かれている。(3)は人工素材に細胞を植えるといった方法で行われ、1981年に Bell が作成した人工皮膚が最初であり、現在、臨床では培養した皮膚、骨および軟骨において実現している。

血管新生の観察の歴史は、透明窓内の血管新生の研究を Arnold(1871)が始め、Clark(1909)は生きたオタマジャクシの尾鰭にガラスをはめ直視下に観察した。哺乳動物の血管を初めて透明窓で観察したのは Sandison(1924)であるが、研究対象として血管およびリンパ管の発生および分化、血管に対する薬物作用、器官移植後の生体適合性の観察など広範囲におよんだ。我々は長期観察が可能な REC モデルを採用したが、

再生医学において血管新生および組織再構築の過程を経時的直視下に観察した報告は少なく興味ある知見が得られるものと期待した。

## 本研究の着想に至った経緯

血管新生研究において、用いるモデルが侵襲的すぎる、あるいは本当に新生しているのか、既存の血管との区別が可能でないモデルが多かった。しかも間接的な証明しかなくないことが問題であった。我々は明らかに新生血管が区別でき、新生血管の長さを定量可能な Rabbit ear chamber (REC)モデルを採用した。このモデルでは観察窓の中に生体材料を留置することが可能であり、直接、細胞親和性、異物反応、血管新生が非侵襲的に経時的に観察可能という利点を有する。

**Preliminary study** として、種々の生体材料およびサイトカイン(ゼラチンスポンジ、ゲル状コラーゲン、繊維状コラーゲン、*rhbFGF*)の組み合わせを留置して血管新生状況を生体顕微鏡下で観察した。血管新生の初期は sprout が静脈側から形成され、また足場の種類により、新生血管の形成速度が異なることが、明かであった。

## 研究計画

平成 16, 17 年度の 2 年間での研究を計画した。

### インテリジェント細胞外環境の設計

1. 足場の材料:①繊維状アテロコラーゲン、②エポキシ架橋スポンジ状コラーゲン、③ゲル状コラーゲン(1% or 3%)、Ⅱ. 市販の材料を利用する ④微細繊維状コラーゲン、⑤スポンジ状ゼラチン、⑥酸化セルロース、⑦スポンジ状コラーゲン、⑧対照として足場(-)で生理的食塩水負荷、他を用いる。
2. 足場の形状:ゲル状、スポンジ状がある。ゲル状のものは *in vitro* での培養実験で良く用いられる。スポンジ状ではループ状に伸展する新生血管はポアサイズに

より伸展速度が異なることが観察された。先端が、ゲル状では血管芽(sprout)の先端がとがっていて伸展速度が速いことがわかった。今回は繊維状のものの利点を活かす。綿状では繊維の直径と細胞親和性に関係が認められる可能性があると考えた。

3. Recombinant human bFGF (rhbFGF)の量と投与方法：rhbFGF はトラフェルミン 100 $\mu$ g/ml (科研製薬)を使用するが、通常の溶解では1回の噴霧で 6 $\mu$ g となる。濃度は溶解時の液量にて調節する。① RECの観察窓を含め傷に噴霧(投与量は噴霧量で調節する)、②足場を rhbFGF に浸す、あるいはゲル状コラーゲンは混合し DDSの条件とする、③足場のみ RECの観察窓内に留置、④対照として生理的食塩水のみ観察窓内に投与する。

#### In vitro 材料の細胞親和性およびサイトカインの評価

1. 足場の pH 測定：5mg の各足場を細胞培養液 2ml に浸し、インキュベートし、1時間後、24 時間後および 72 時間後に培養液の pH を測定する。これにて材料から溶け出す物質の影響を調べる。
2. 細胞培養での足場の評価：足場上で細胞が増殖するか、あるいは細胞がコンフルエントになったところに足場材料を留置した場合に細胞に悪影響を及ぼさないか調べる。市販の材料で吸収されるから細胞親和性が良いとされている物も短期間の培養では溶出する化学物質の影響で細胞親和性は悪い物がある。
3. DDS としての徐放効果：rhbFGF に浸した足場からの rhbFGF の溶出を時間毎に培養液を交換し、ELISA にて測定する。
4. 観察窓内の内因性サイトカインの測定：開閉可能な REC を術後 1, 3 & 7 日目に蓋を取り、観察窓内の貯留液を採取し、ELISA 法にて bFGF、TGF $\beta$ 、PDGF、インターロイキン-6 などの濃度を測定する。

#### 動物実験モデル

Rabbit ear chamber モデル：家兔の片方の耳介にアクリル板と雲母板の観察窓(直径:6.4mm)を作成し装着する。術後は作成直後から連日、非侵襲的経時的直視下に顕微鏡下に観察し、ビデオにおさめる。また、観察野を拡大させて1週間に1回のマクロ撮影を行う。

#### 血管新生と組織再構築の評価

1. 血管新生の評価：顕微鏡下の観察から、細胞侵入、血管芽の形成、足場上の細胞付着、足場の吸収具合を評価する。足場の種類により血管芽の形が異なることを観察する。24 時間での新生血管の伸展距離を測定する。組織再構築の速度は細胞、細胞外マトリックス、サイトカインの組み合わせである程度決まることが考えられ、足場は細胞外マトリックスの骨組みとして重要な役割を果たすことが考えられる。サイトカインに関しては内因性および外因性が考えられ、足場によっては内因性サイトカインを吸着および徐放し、外因性サイトカインは足場が DDS の役割を果たして良い影響を与えることを期待している。
2. 血管新生の定量評価：撮影したマクロ写真を取り込み、Photoshop (Adobe 社, ver 6)で加工し、NIH Image (ver. 1.62)にて新生血管面積、血管侵入距離を測定することにより伸展速度を計算する。
3. 組織再構築の評価：血管、軟骨、皮膚の再生の観察。
4. 摘出しての組織学的：動脈から固定液を灌流し REC 自体を固定したのち sprouts、新生血管及びリモデリングに参加した血管壁細胞の評価。動脈壁の平滑筋細胞、周皮細胞の種類、配列(短軸方向 or 長軸方向)を行う。使用する樹脂は硬さの選択種類が多い Microfil (Flow Tech, Inc., MA, USA)の黄色を使用した。これは specific gravity: 1.04, viscosity, centipoise 25, Gel time 90 分の性質を持ち粘度および凝固時間が適切である。

5. Progenitor endothelial cell の評価 : CD34 の検出を Maeda M (J Biomed Mater Res, 51:55, 2000)の方法にて評価する。
6. 血管反応性 : REC 内の細小血管の反応性を Avionics 社の thermography にて評価する。

## 研究成果と参考論文

この報告書の研究成果 2 としてまとめた『血管新生と組織再構築に関係する足場と血管新生因子』は、過去における血管新生研究からの疑問点を示し、また基礎研究として行った血管の伸展について述べた。研究成果 3 の『A single local application of recombinant human basic fibroblast growth factor accelerates initial angiogenesis during wound healing in rabbit ear chamber』は、今まで血管新生因子を使用してもその効果が明らかになり難かったが、伸展速度を定量し、その結果を考察した。

参考論文は本研究を進めていく上で重要であった心臓血管外科および人工臓器からの論文を載せた。血管新生研究を始めたきっかけは人工血管上に内皮細胞を効率よく誘導することをめざしたが、『人工血管-この1年の動き』において最近の人工血管に関する基礎的および臨床研究を総括した。また、再生医療において足場は重要であるが、『Clinical benefits and risk analysis of topical hemostats: A review』において市販のコラーゲン製止血材を中心に利点および欠点を述べた。市販の止血材は細胞親和性が良好であると思われるが、実は優劣があるということ、『局所止血材の細胞毒性と組織親和性の in vitro および in vivo 評価』にて示した。再生医療および植え込み材料を研究するきっかけとなったのはコラーゲン製止血材であり、その原点となった『綿状コラーゲン製止血材の吸血性、止血性及び純度の評価』を載せた。臨床において吸収性止血材料は使用すると速やかに吸収し、合併症をおこしにくいと思われていたが、『局所止血材料により冠動脈バイパスグラフトに狭窄を来したと思われる 1 症

例』を経験し、速やかに吸収されるはずの止血材が遠隔期に残留することを経験した症例である。

人工臓器をつなぎ止めておく縫合糸は重要な役割を占めているが、断裂した断端を観察する機会は少ない。『Deterioration of Suture Materials at Prosthetic-Host Anastomoses』において、布製人工血管に用いた縫合糸が断裂し、その断端が三角錐になることを観察した。人工血管上では内皮細胞が伸展しにくいことは良く知られているが、『Endothelialization and Functional Neointima on Vascular Grafts in Human』において人工血管と内皮細胞の関係を述べた。

動脈グラフトを用いての冠動脈バイパス術では動脈グラフトが 1 本より、2 本用いた方が生存率が良いことが知られているが、これが糖尿病においてもあてはまることを『Bilateral versus unilateral internal mammary revascularization in patients with diabetes』にて、また 3 本動脈を in situ で用いることが優れていることを『Survival benefit of exclusive use of in situ arterial conduits over combined use of arterial and vein grafts for multiple coronary artery bypass grafting』にて示した。この報告書の最後に、chemoablation を用いて前立腺肥大症を治療した遠隔成績を『Transurethral Ethanol Injection Therapy for Prostatic Hyperplasia: 3-Year Results』にて示した。無水エタノールで組織を変性させる治療法は前立腺においては今後期待されることを 3 年間の成績で示した。

## まとめ

この度は『機能的足場に rhbFGF を組み込んだ人工臓器・生体材料への血管新生と組織再構築』の研究を行ったが未だ解明されていない部分は多数あり、さらに研究を進めていきたい。



## 血管新生と組織再構築に関係する足場と血管新生因子

東京女子医科大学心臓血管外科 富澤康子

虚血性心疾患の血管新生療法は 1990 年代に盛んになった。特に、Yanagisawa-Miwa らが Science に報告したリコンビナント bFGF を用いた研究 (図 1) は多数の人に注目された。この研究以来、血管数が増加したのを「新生した」と勘違いした報告 (図 2) が多くなされた。

血管が新生したという証明は、「血管密度の増加」、「心機能の改善」、「側副血行路の描出」、「血流の増加」、「温度の上昇」などの間接的証明 (図 3) を持ってなされることが多い。新生血管を直接的に証明するには「血管の無いところに血管が新生した」、「血管が伸展した」、「血管芽の形成から成熟血管までの過程を追える」(図 4) 等がある。REC モデルにおける血管伸展 (図 4 左)、血管芽の観察 (図 4 中: ↑)、また人工真皮に侵入する血管 (図 4 右) の画像がえられている。

1996 年に Isner らが VEGF を用いて下肢に血管新生療法を試み、副作用として血管腫を形成した症例が Lancet に報告された (図 5)。この症例では血管新生の制御に失敗し、下肢の浮腫などの合併症が出現し、切断となった (図 6)。これは臨床における、血管新生因子を用いて血管新生を誘導し、evidence をもって血管新生を示した数少ない報告である。

本研究の主要な部分は成果論文 3 に示したが、本研究の一部として長年興味を持っていた「琥珀 amber」の周囲の血管新生について述べる。映画「ジェラシック・パーク」(製作総指揮: スピルバーグ) では恐竜の血を吸った蚊の化石から DNA を取り出し、恐竜を作ったサイエンスフィクションである。科学論文を検索すると、琥珀の中から *staphylococcus succinus* sp. nov.

(Lambert LH, International Journal of Systematic Bacteriology, 1998) とか、microorganisms を多数抽出した (Greenblatt CL, Microbial Ecology, 1999) 報告がある。また、最近ではドミニカ共和国から掘り出された 2 千万年前の蜘蛛の琥珀から数滴分の血液成分を抽出したことが新聞にに掲載された (朝日新聞、05 年 10 月 1 日夕刊)。琥珀の中に閉じこめられた DNA が長時間、外からの影響を受けても変化しないほどの“保存容器”であるならば、琥珀自体が植え込み材料として機能するはずであると考えた。

岩手県久慈は世界三大琥珀産地の一つであり、8500 万年前の日本で最も古い年代の琥珀が採掘されている。世界的にも珍しい「鳥の羽毛入りの琥珀」が採掘された (朝日新聞、03 年 10 月 18 日)。この新聞記事を見て、琥珀が材料として可能であるのではとひらめいた。岩手県久慈産の琥珀を粉碎してもらい、45 $\mu$ m のふるいにかけて粒を材料として、REC モデルの観察窓内に留置した。血管伸展を観察し (図 7-9)、さらに摘出した標本を走査電子顕微鏡を用いて観察した (図 10)。何も処理していない琥珀粒では含まれている不純物 (可燃性鉱物油) 以外は細胞の増殖・伸展を妨げず、血管の伸展をも妨げないことが観察された。また、琥珀粒の周囲に結合組織が良好に形成され、治癒を阻害しないことが示された。このことは琥珀が植え込み材料として使用できる可能性を示唆している。

血管新生と組織再構築の研究では、関係する問題として足場と血管新生因子が大きい。解決しなくてはならない問題はたくさんあるが、努力して研究を進めたい。

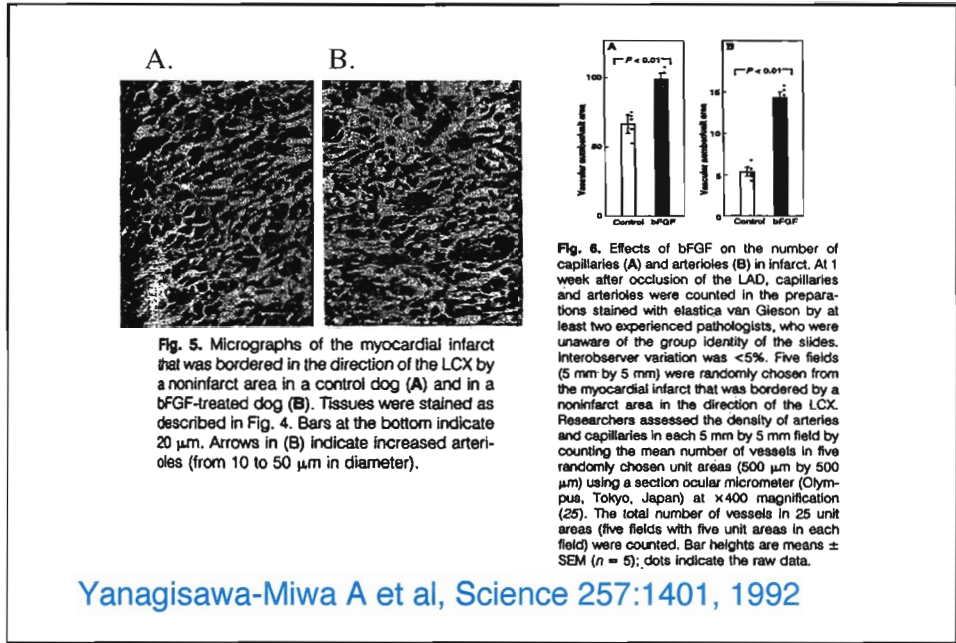


図1 虚血性心疾患の血管新生療法はこの報告から始まった

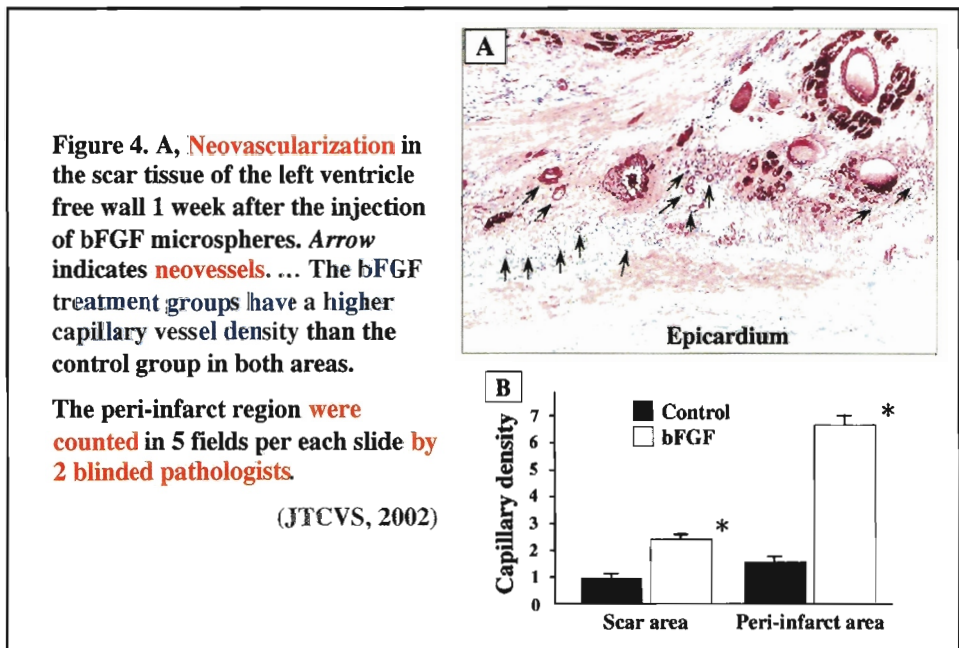


図2 血管新生の証明が正しくなされなかった

### 新生血管の間接証明

- 血管密度が増した
- 心機能が良くなった
- 側副血行路が造影された
- 血流が増えた
- 温度が高い

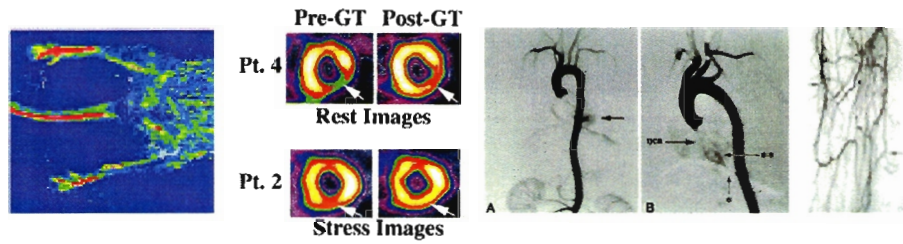


図3 新生血管の間接証明

### 新生血管の直接証明

- 血管の無いところに血管が新生した
- 血管が伸展した
- 血管芽の形成から成熟血管までの過程を追える

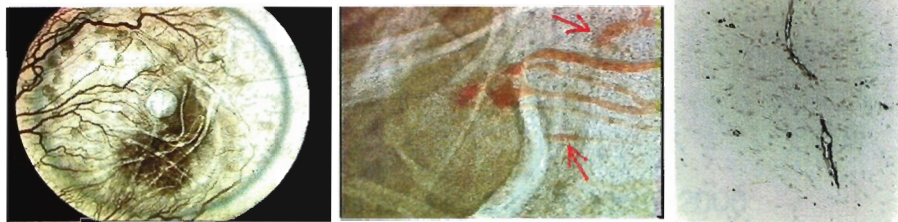


図4 新生血管の直接証明



### Clinical Evidence of Angiogenesis After Arterial Gene Transfer of phVEGF<sub>165</sub> in Patient with Ischemic Limb

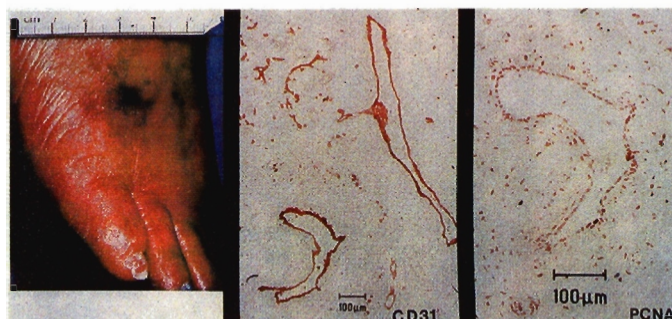


Figure 3: Spider angioma and immunostaining  
Left: one of three spider angiomas that developed about 1 week after gene therapy in distal portion of ischaemic limb. Middle and right: tissue sections stained with antibody to endothelial antigen CD31 show vascularity of lesion, white stain of adjacent section for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) shows extent of proliferative activity among endothelial cells in lesion.

Isner JM, et al, Lancet 348:370, 1996

図5 症例報告：血管新生が下肢虚血に起こった

### The Clinical Manipulation of Angiogenesis: Pathology, Side-Effects, Surprises, and Opportunities with Novel Human Therapies

#### Isnerがlancetに報告した症例の結末

- 12週間後には形成された血管腫は退縮した。
- ひどい下肢の浮腫がでた。
- 下肢は切断された。

Thompson WD, et al, J Pathol 190:330, 2000

図6 血管新生の制御は困難である

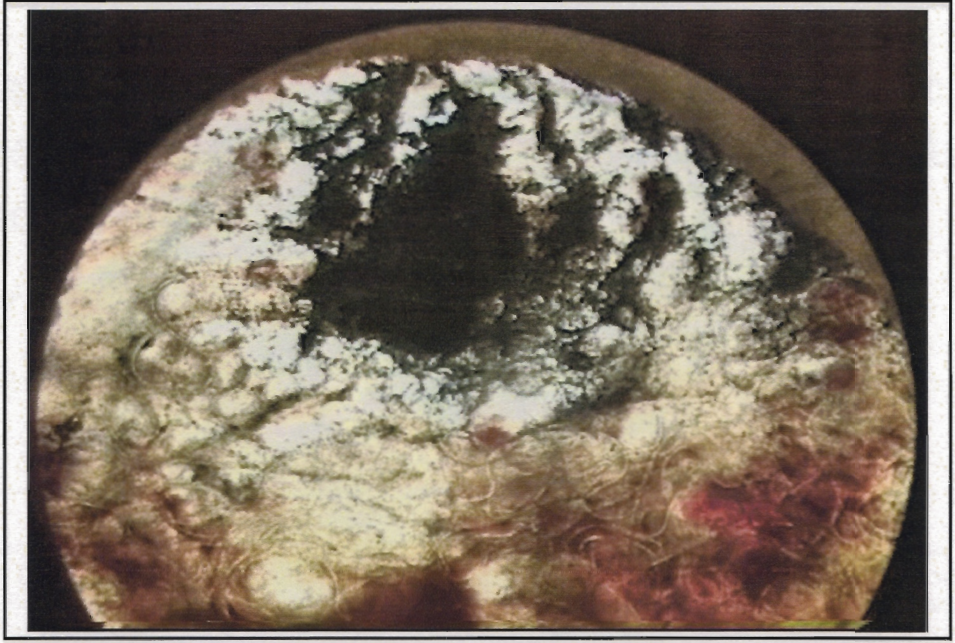


図7 琥珀粒および綿状コラーゲンを留置したREC 4日後

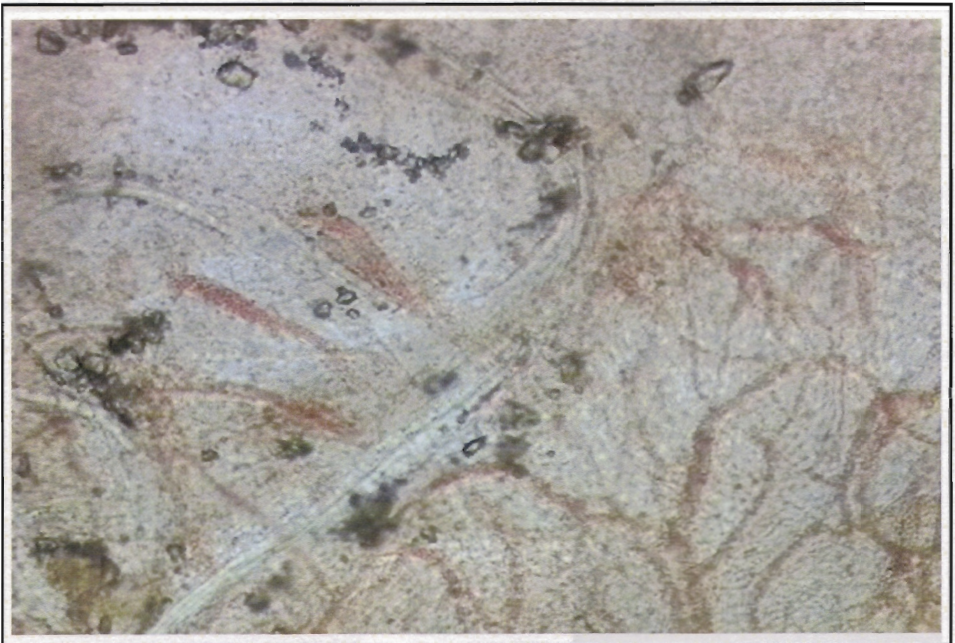


図8 琥珀粒の周囲に血管芽が観察できる 11日後



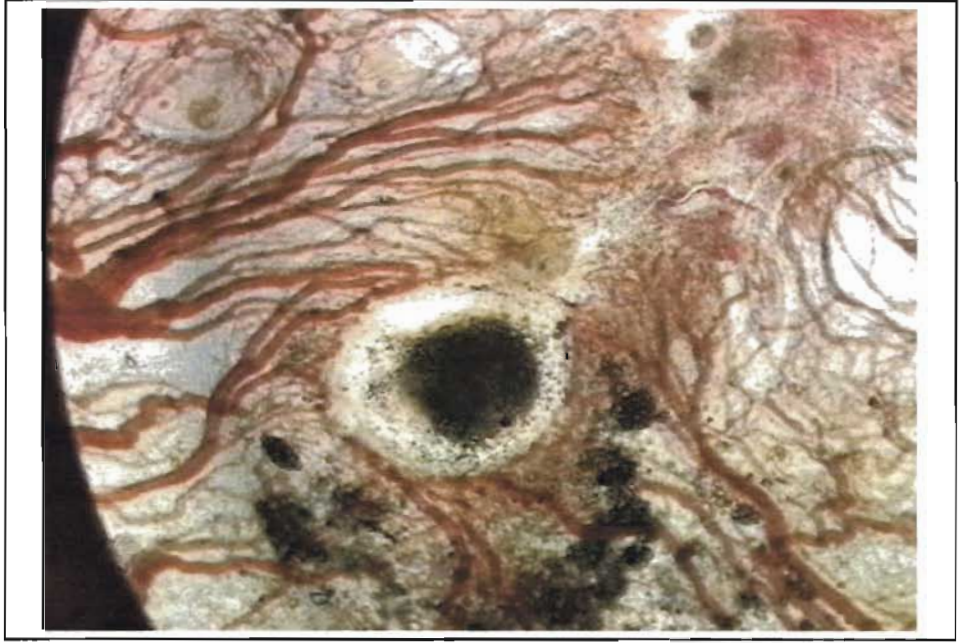


図9 琥珀粒の周囲に浸出液の貯留を認めず、血管侵入も認めない間隙が観察された。RECモデル 3週間後

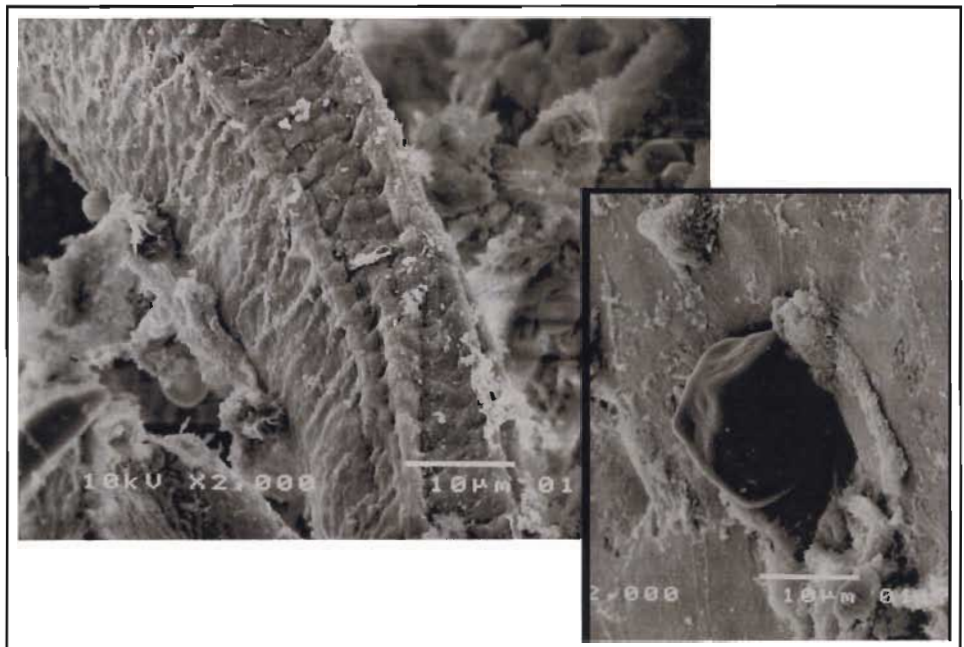


図10 血管（左）および琥珀粒（右）。血管の表面に連続する数珠状の突起物が観察された。神経か？琥珀粒は宿主により形成された膠原繊維により包まれていた。RECモデル 5週間後