

虚血心筋への血管新生因子を用いた血管の誘導と  
画像三次元構築による壁構成細胞の評価

(課題番号 13470279)

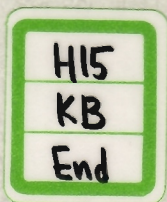
平成13, 14, 15年度科学研究費補助金 (基盤研究B)  
研究成果報告書



平成16年3月

研究代表者 遠藤真弘

(東京女子医科大学心臓血管外科学講座 教授)



虚血心筋への血管新生因子を用いた血管の誘導と  
画像三次元構築による壁構成細胞の評価

(課題番号 13470279)

平成13, 14, 15年度科学研究費補助金 (基盤研究B)  
研究成果報告書

平成16年3月

研究代表者 遠藤真弘

(東京女子医科大学心臓血管外科学講座 教授)



## 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	9
2. 虚血心筋への血管新生因子を用いた血管の誘導	13
3. 血管新生療法（レーザー心筋血行再建術）	25
4. 血管新生の速度；創傷治癒において血管新生を促進する条件	29
3. 参考論文	
1. Benefit of bilateral over single internal mammary artery grafts for multiple coronary artery bypass grafting	37
2. Coronary artery bypass with only in situ bilateral internal thoracic arteries and right gastroepiploic artery	45
3. Bilateral versus unilateral internal mammary revascularization in patients with diabetes	51
4. Angiographic findings and surgical treatments of coronary artery involvement in Takayasu arteritis	59
5. Coronary Artery Bypass Grafting in 105 Patients with Hemodialysis-Dependent Renal Failure	67
6. Off-pump reimplantation of anomalous origin of the right coronary artery	73
7. Aortic valve replacement in the calcified small aortic root by hemitranslocation of the valve	77
8. Reconstruction of left ventricle in patient with cardiac hemangioma at apex	81
9. CABGのスタンダード、先端外科医療の最前線	91
10. 冠血行再建術；適応、術式の選択、遠隔成績	97
11. 冠状動脈疾患を有する腹部大動脈瘤の手術戦略-一期的か二期的か、off-pumpかon-pumpかの選択	111
12. 虚血性心筋症（EF $\leq$ 0.2）に対する単独CABGあるいは左室リモデリング（DOR法、瘤切除）	119
13. 冠外科と弁外科の合併手術の早期及び遠隔成績	123
14. 人工血管-この1年の進歩	129

## はしがき

東京女子医科大学心臓血管外科学 遠藤真弘

外科的に血行再建が不可能なほど冠動脈が細すぎる症例、あるいは経皮的冠動脈形成術も不可能な細い冠動脈の症例に対し、虚血心筋への血管誘導や、心筋再生療法が盛んに試みられている。現在まで、臨床において血管新生を促すとされる種々のサイトカインをプロテインの形で、または遺伝子の形で導入したり、未分化な細胞を含む骨髄組織の移植、さらには、Transmyocardial Laser Revascularization (TMLR) 等が試みられてきた。血管新生の無い、心筋再生には限界が有ることも最近の研究で判明しつつある。また、細胞あるいは動物実験においては遺伝子導入、あるいは増殖因子が有効との結果がでて、いざ臨床的に用いると評価できるほどの優れた血管新生が誘導されるわけではない。

本研究では、主に、家兎の創傷治癒モデルを用いて血管新生因子(線維芽細胞増殖因子)の影響下における血管進展過程の観察および血管形成面積測定を定量的に行った。非侵襲的直視下に血管新生過程が観察可能である rabbit ear chamber モデル(REC)において血管新生因子を散布した B 群および対照の生理的食塩水を散布した C 群の比較では、7 日後には B 群の方が血管形成面積が有意に大きかった。しかし 14 日後になると B 群と C 群では有意差がなくなった。このことから手術時に局所的に1回使用したときんの効果は術後 7 日目までしか観察されず、有効持続期間に限られていたことが明らかになった。その為に血管新生因子の使用 방법에、多数回使用、徐放化などの新たな工夫が必要であることが考えられた。

REC モデルにおける血管形成は常に周囲に線維芽細胞と思われる多数の細胞に囲まれて起こっていた。我々はさらに壁構成細胞の評価を試みた。新生血管が形成されて 3 週間後には動静脈が壁の厚さにより区別ができる様になったが、内皮細胞、平滑筋細胞および線維芽細胞の免疫組織学的な区別は今回の研究期間内には行えなかった。生体顕微鏡下に観察すると血管内面を被覆している細胞は隙間なく、表面には血栓はなく白血球の存在が確認できた。

さらに、血管新生を速やかにする条件を求めるのを目的に、細胞親和性の良好な足場(scaffold)を REC 内に留置したところ、丈夫で出血しにくい血管芽が形成されることを観察した。治癒不全の患者において、本法を用いることにより治癒を促進できる可能性が示唆された。さらに研究を進めたい。



1. 研究課題名:研究組織・研究経費・研究発表

【研究課題名】

虚血心筋への血管新生因子を用いた血管の誘導と画像三次元構築による壁構成細胞の評価

研究課題番号 13470279

【研究組織】

研究代表者 遠藤真弘(東京女子医科大学心臓血管外科教授)

分担研究者 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 13 年度	2,200 千円
平成 14 年度	1,400 千円
平成 15 年度	1,400 千円
計	5,000 千円

【研究発表】

学会誌

1. 遠藤真弘:冠動脈の臨床(上)、CABG:世界の動向と我が国の現状、日本臨床、61:558-596, 2003
2. 遠藤真弘:冠動脈の臨床(上)、直視下経管的冠動脈形成術、日本臨床、61:534-539, 2003
3. 富澤康子、小森万希子、高田勝美、西田博、遠藤真弘、黒澤博身:コラーゲン製止血材の生体顕微鏡による評価;組織親和性及び吸収性、日心血外会誌、32:17-22, 2003
4. Tomizawa Y. Vascular grafts: basic research and clinical applications. In: Tura A, ed. Vascular grafts: Experiment and modelling. in Vol. 34. International Series on Advances in fluid mechanics. Southampton: WIT press, 2003:1-39.
5. 富澤康子、遠藤真弘、西田博、小柳仁:左室瘤の外科治療後の遠隔成績、胸部外科、56:528-531, 2003
6. 鈴木豊、富澤康子、小森万希子、高田勝美:血管新生過程の観察、-ND フィルターの利用による観察域の拡大-、呼と循、51:507-510, 2003
7. Endo M, Tomizawa Y, Nishida H, Aomi S, Nakazawa M, Tsurumi Y, Kawana M, Kasanuki H: Angiographic findings and surgical treatments of coronary artery involvement in Takayasu arteritis, J Thorac Cardiovasc Surg, 2003; 125: 570-7
8. Takada K, Komori M, Notoya A, Tomizawa Y, Ozaki M. Effect of ulinastatin on microcirculation during excessive hemorrhage using fluid therapy. In Vivo 2003; 17:129-35.
9. Komori M, Takada K, Tomizawa Y, Uezono S, Ozaki M. Urinary trypsin inhibitor improves peripheral microcirculation and bronchospasm associated with systemic anaphylaxis in rabbits in vivo. Shock 2003; 20:189-94.
10. Uchikawa S, Aomi S, Kawai A, Yamazaki K, Tomizawa Y, Nishida H, Endo M, Koyanagi H: Left ventricular mass index reduction early after an isolated aortic valve replacement with St. Jude Medical 19A-HP. Jpn J Thorac Cardiovasc Surg 51:361-367, 2003
11. Endo M, Tomizawa Y, Nishida H. Bilateral versus unilateral internal mammary revascularization in patients with diabetes. Circulation 2003; 108:1343-9.

12. 富澤康子:麻酔科医に役に立つ人工血管の知識、臨床麻酔、27(5):807-812, 2003
13. 遠藤真弘、富澤康子:CABG のスタンダード、先端外科医療の最前線、医学のあゆみ、205:678-682, 2003
14. 遠藤真弘、富澤康子、西田博:血管新生療法(レーザー心筋血行再建術)、IV.血管新生・再建療法、冠動脈の臨床(上)-21 世紀の診断治療体系、日本臨床、61(増刊):704-706, 2003
15. 遠藤真弘、富澤康子、西田博、黒澤博身:冠血行再建術;適応、術式の選択、遠隔成績、冠動脈の臨床(下)-21 世紀の診断治療体系、日本臨床、61(増刊):105-117, 2003
16. 遠藤真弘、青見茂之、富澤康子、内川伸、木原信一郎、山崎健二、西田博、黒澤博身:冠状動脈疾患を有する腹部大動脈瘤の手術戦略-、胸部外科、56:619-625, 2003
17. 富澤康子、遠藤真弘、木原信一郎、斎藤聡、石戸谷浩、山崎健二、青見茂之、西田博、黒澤博身:再冠状動脈再建術-on-pump と off-pump の比較・検討、胸部外科、56:221-226, 2003
18. 富澤康子:最近話題の人工血管、心臓血管麻酔学会雑誌、7:3-6, 2003
19. 西田博、富澤康子、遠藤真弘、黒澤博身、吉田悦子、大橋靖雄:心臓血管外科の医療経済、心臓血管外科(5)、Cardiovascular Med-Surg 5:317-330, 2003
20. 富澤康子:2.心電図[85 歳の心電図]、岩手県 85 歳追跡調査、p.82-87, 2003 年、財団法人 8020 推進財団、社団法人岩手県歯科医師会、岩手県、岩手医科大学、8020 報告書、2003
21. 富澤康子:人工血管、医療材料・医療機器の安全性と生体適合性、新材料・新素材シリーズ、土屋利江編集、シーエムシー出版、2003、p.118-122
22. Nakajima M, Aomi S, Matsuda N, Kasanuki H, Endo M, Kurosawa H. Simultaneous biventricular pacemaker implantation for a surgical case of aortic regurgitation with severe left ventricular dysfunction and left bundle branch block. J Thorac Cardiovasc Surg 2003; 125:1167-9.
23. Ishida T, Kurosawa H, Nishida H, Aomi S, Endo M. Sequential bypass using the right gastroepiploic artery for coronary artery bypass grafting. Jpn J Thorac Cardiovasc Surg 2003; 51:277-81.
24. 内川伸、木原信一郎、上部一彦、山崎健二、富澤康子、川合明彦、青見茂之、西田博、遠藤真弘、小柳仁:下壁梗塞による中隔解離瘤の経験、胸部外科、55:135-139, 2002
25. 西田博、黒澤博身、佐藤渉、富岡秀行、盆小原幸宏、野々山真樹、山崎健二、富澤康子、川合明彦、青見茂之、遠藤真弘:Conventional CABG の再評価、脈管学、42:425-432, 2002
26. Tomizawa Y, Suzuki Y, Miyama A, Komori M, Takada K, Nishida H, Endo M. Macroscopic sequential pictures of angiogenesis in a rabbit ear chamber. J Invest Surg. 15:269-74. 2002
27. Tomizawa Y, Endo M, Nishida H, Koyanagi H. Acute occlusion of coronary artery bypass graft with nonionic contrast medium. Jpn J Thorac Cardiovasc Surg. 2002; 50:181-3.
28. Endo M, Nishida H, Chikazawa G, Tomizawa Y. Aortic valve replacement in the calcified small aortic root by hemitranslocation of the valve. Artif Organs. 2002; 26:483-6.
29. 富澤康子、小森万希子、高田勝美、西田博、遠藤真弘、黒澤博身:血管新生の速度;創傷治癒において血管新生を促進する条件、冠疾患誌、8:38-40, 2002

30. 内川伸、西田博、遠藤真弘、近澤元太、小澤英樹、山寄健二、川合明彦、富澤康子、青見茂之、小柳仁: In situ 両側内胸動脈と橈骨動脈を用いた all arterial graft 冠状動脈バイパス術の検討、胸部外科、55:1006-1010, 2002
31. 西田博、黒澤博身、富澤康子、遠藤真弘、古堅あずさ、石塚尚子、笠貫宏: 【透析患者の心不全】透析患者に見られる弁疾患、透析患者の合併症とその対策、11 号 29-35, 2002
32. 西田博、黒澤博身、佐藤渉、富岡秀行、盆子原幸宏、野々山真樹、山崎健二、富澤康子、川合明彦、青見茂之、遠藤真弘: Conventional CABG の再評価 安全で質の高い complete arterial grafting と虚血性心筋症に対する意義について、脈管学、42:425-432, 2002
33. 西田博 黒澤博身、遠藤真弘 小柳仁、上塚芳郎: 医療費削減・包括化時代に向けてのインターベンション: 累積医療費を考慮した CABG とコスト比較の重要性、Jpn J Interv Cardiol、17:53-58, 2002
34. Nishino S, Goya N, Ishikawa N, Tomizawa Y, Toma H. An experimental study of self-expanding ureteric metallic stents: macroscopic and microscopic changes in the canine ureter. BJU Int. 2002; 90:730-5.
35. Komori M, Takada K, Tomizawa Y, Ozaki M: Effects of ulinastatin on microcirculation under systemic anaphylaxis, Microcirculation annual, 18:47-48, 2002
36. Morishita A, Kitamura M, Noji S, Aomi S, Endo M, Koyanagi H. Long-term results after De Vega's tricuspid annuloplasty. J Cardiovasc Surg (Torino) 2002; 43:773-7.
37. Kihara S, Kawai A, Endo M, Koyanagi H, Kurosawa H. Extracorporeal membrane oxygenation and left ventricular assist device: a case of double mechanical bridge. Heart Vessels 2002; 16:164-6.
38. Tsukui H, Aomi S, Endo M, Koyanagi H. Acute aortic dissection in a patient with idiopathic dilated cardiomyopathy. Jpn J Thorac Cardiovasc Surg 2002; 50:309-10.
39. Aomi S, Nakajima M, Nonoyama M, Tomioka H, Bonkohara Y, Satou W, Kunii Y, Endo M: Aortic root replacement using composite valve graft in patients with aortic valve disease and aneurysm of the ascending aorta. Artif Organs 26:467-473, 2002
40. Niki K, Komiya N, Ishizuka N, Iwade K, Nishikawa T, Nakamura K, Endo M, Kasanuki H: Subepicardial aneurysm after anticoagulant therapy for a mural thrombus following anterior myocardial infarction. Heart Vessels 16:72-74, 2002
41. Kihara S, Kawai A, Fukuda T, Yamamoto N, Aomi S, Nishida H, Endo M, Koyanagi H: Effects of milrinone for right ventricular failure after left ventricular assist device implantation. Heart Vessels 16:69-71, 2002
42. Aomi S, Niinami H, Nozi S, Uwabe K, Kihara S, Kurihara T, Endo M, Koyanagi H: Surgery of the ascending aorta and/or aortic arch using deep hypothermic circulatory arrest with retrograde cerebral perfusion and open technique, Volume 7, Kawada S, Ueda H, Shimizu H edited, Cardio-aortic and Aortic Surgery, Springer-Verlag Tokyo 2001 99-104
43. Nishida H, Yamazaki K, Endo M, Koyanagi H, Tajima K, Higuchi K, Mori T: Development of the implantable centrifugal right ventricular assist device: combined use with LVAD as an alternative to the total artificial heart, J Congestive Heart And Circulatory Support, 1;213-217, 2001
44. 遠藤真弘 小柳仁: 狭小大動脈弁輪に対する手術の歴史と新しい展開、内科、87: 43-47, 2001
45. 遠藤真弘、青見茂之、西田博、小柳仁: Off-pump バイパスの功罪、Cardiovascular Med-Surg、2:142-149, 2001



46. 遠藤真弘: 日本冠疾患学会の概要、Cardiovascular Med-Surg, 3:319, 2001
47. 遠藤真弘: 第 38 回日本人工臓器学会大会座長報告、人工臓器、30;37, 2001
48. 遠藤真弘: 死の定義と生存率、心臓、33:273-275, 2001
49. 富澤康子、遠藤真弘、西田博、栗原寿夫、内川 伸、石田 徹、小柳仁: 医師が患者になったときの冠動脈バイパス術; 遠隔成績、日医雑誌、126:258-262, 2001
50. 富澤康子: 人工血管-この1年の進歩、人工臓器、30:96-97, 2001
51. 内川伸、栗原寿夫、木原信一郎、野地智、富澤康子、西田博、遠藤真弘、小柳仁: 末期肝細胞癌と診断された 83 歳に対する off-pump CABG、冠疾患誌、6(4):191-193, 2001
52. 石田 徹、西田博、富澤康子、野地 智、富岡秀行、森下 篤、遠藤真弘、小柳仁: *In situ* 動脈グラフトのみによる 4 枝以上の冠動脈バイパス術の検討、日心外会誌、30:11-14, 2001
53. 津久井宏行、遠藤真弘、平沢友司郎、近沢元太、栗原寿夫、富澤康子、川合明彦、青見茂之、西田博、小柳仁: 虚血性心疾患と腹部大動脈瘤に加え他臓器疾患を合併した症例に対する治療、術後腹部大動脈破裂をきたした 2 例より学ぶ、胸部外科、54(5):370-373, 2001
54. 津久井宏行、富澤康子、斎藤典彦、星野修一、西谷泰: 開心術患者に対するタウリン(2-アミノエタンスルホン酸)の有用性の検討、ICUとCCU、25:947-953, 2001
55. 西田博、山崎健二、富澤康子、川合明彦、青見茂之、遠藤真弘: 第二次人工心肺革命と医工学的支援、医工学治療、13:73-80, 2001
56. 西田博、津久井宏行、島袋高志、中島雅人、内川伸、小澤英樹、近沢元太、前田朋大、山崎健二、富澤康子、川合明彦、青見茂之、遠藤真弘、小柳仁、二階堂洋史、田中美樹、遠山範康: Off pump CABG (OPCAB)困難な頭頸部血管高度狭窄症例に対する on pump CABG における拍動流発生装置としての IABP の有用性、循環器科、49:280-281, 2001
57. 遠藤真弘、島村吉衛、富澤康子、西田博、小柳仁: 糖尿病を合併する虚血性心疾患-CABG 実施の適応・成績・予後-, Ischemic Heart Disease (IHD) Frontier, 2(1):45-57, 2001
58. 古川博史 青見茂之 野地 智 上部一彦 木原信一郎 栗原寿夫 川合明彦 西田博 遠藤真弘 小柳仁: 腹部大動脈瘤を合併した胸部大動脈瘤に対する外科治療、日心外会誌、30:285-289, 2001
59. 岡田尚之 鶴見由起夫、笠貫 宏 西田博、遠藤真弘: 冠動脈バイパス術後の経皮的冠動脈インターベンションの初期成績及び遠隔期予後の検討、J Cardiol、38:111-121, 2001
60. 西田博 遠藤真弘、小柳仁: 径心筋レーザー血行再建術(TMR)、診療手帖、149:1-4, 2001
61. 西田博 遠藤真弘、小柳仁: 外科からレーザーの応用、Heart View、5:256-264, 2001
62. 西田博 遠藤真弘: Lasers for Ischemic Heart Disease、脳と心臓をめぐる物語、J Cardiol、38:51-53, 2001
63. 西田博 遠藤真弘、小柳仁: レーザー心筋内血行再建術、Cardiovascular Med-Surg、3:161-172, 2001
64. Nishida H, Uchikawa S, Chikazawa G, Kurihara H, Kihara S, Uwabe K, Tomizawa Y, Endo M, Koyanagi H: Coronary Artery Bypass Grafting in 105 Patients with Hemodialysis-Dependent Renal Failure. Artif Organs, 25:268-272. 2001

65. Nishida H, Tomizawa Y, Endo M, Koyanagi H, Kasanuki H. Coronary artery bypass with only in situ bilateral internal thoracic arteries and right gastroepiploic artery. *Circulation*. 2001; 104:I76-I80.
66. Endo M, Nishida H, Tomizawa Y, Kasanuki H: Benefit of bilateral over single internal mammary artery grafts for multiple coronary artery bypass grafting, *Circulation*, 104:2164-2170, 2001
67. Endo M, Nishida H, Tomizawa Y, Koyanagi H, Kiekata T: Off-pump reimplantation of anomalous origin of the right coronary artery, *Jpn Circ J* 2001; 65:471-472
68. Tomizawa Y, Endo M, Nishida H, Koyanagi H: Reconstruction of left ventricle in patient with cardiac hemangioma at apex, *Ann Thorac Surg*, 71:2031-4, 2001
69. Ishida T, Nishida H, Tomizawa Y, Endo M, Koyanagi H: Sextuple coronary artery bypass grafting using only in situ arterial conduits, *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 7:183-5, 2001
70. Goya N, Ishikawa N, Tomizawa Y, Ryoji O, Ito F, Onitsuka S, Yamaguchi Y, Toma H. Electro vaporization using a rollerball electrode for flat or small papillary tumors of the bladder: basic study in dogs. *J Endourol*. 2001; 15:951-5.
71. 富澤康子:人工血管、21世紀心臓外科学、p417-421、小柳仁監修、自然科学社、東京
72. Oka N, Aomi S, Tomioka H, Endo M, Koyanagi H: Surgical treatment of multiple aneurysms in a patient with Ehlers-Danlos syndrome. *J Thorac Cardiovasc Surg* 121:1210-1211, 2001
73. Endo M: Coronary artery bypass grafting in patients on chronic hemodialysis in japan. *Artif Organs* 25:237-238, 2001
74. Tsukui H, Aomi S, Nishida H, Endo M, Koyanagi H: Ostial stenosis of coronary arteries after complete replacement of aortic root using gelatin-resorcinol-formaldehyde glue. *Ann Thorac Surg* 72:1733-1735, 2001f

## 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 遠藤真弘

### 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

血管新生の研究法には培養血管内皮細胞を用いる *in vitro* 法と鶏卵尿漿膜、観察窓や角膜ポケット法を利用する *in vivo* 法があり、血管新生に対する増殖因子や抑制因子の影響が解明されつつある。実験的にはシャーレの上にて管腔形成を観察し、家兎の *in vivo* モデルにて血管新生を示してきた。

臨床において、虚血心筋への新生血管の誘導は新しい治療法として外科的に再建できない部位へ血液を届けるのを目的に種々のサイトカイン、遺伝子導入、骨髄組織、transmyocardial laser revascularization (TMLR) 等が用いられてきた。心臓において血管新生を証明したり、過程を示すことは困難であり、そのため心臓における新生された血管の直接証明が望まれ、手段の開発が待たれていた。

組織切片は二次元であり連続切片を作成しても、三次元的な血管走行は捉えがたい。共焦点レーザー顕微鏡(confocal laser scanning microscope; CLSM)は得られた像をコンピュータで立体的に構築でき、また蛍光多重染色により周囲との関係を調べることができるという利点を有する。今回我々は、CLSM等の現在使用可能な手段を用いて、心臓に

おける血管新生療法の効果判定を可能にすれば治療法選択において極めて有効であると考えた。

### 研究の目的

本研究の目的は *in vivo* 心筋虚血モデルに血管新生療法を施し、新生血管を共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)等を用いて画像を得、得られた画像をコンピュータで三次元的に構築することにより、新生過程の sprout の形成状況、毛細血管の構造、血管の連続性、血管網、細動脈、細静脈を経時的に評価する。血管新生方法としては"骨髄組織心筋内注入モデル"、血管新生因子徐放モデル(Folkman J, 1993)等のモデルおよび細胞外環境を整えた Rabbit ear chamber モデルを用いる。さらに生体蛍光色素染色法にて血管壁を構成している細胞を染色し、細胞外基質の三次元的分布の解析を含めて血管壁構築の評価を行う。基本的には、CLSMでの心筋、毛細血管とリンパ管の分布状況、結合組織との関連の三次元的な局在を評価する。血管新生療法の優劣がつけられよう努力する。この研究は、将来、新たに開発されるであろう多数の血管新生療法の効果判定への発展を目指した基礎研究であり、虚血性心疾患の治療の進歩に大いに貢献すると考えた。

### 学術的な特色・独創的な点

①組織切片像から三次元像の推定は困難であるが、共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)等を用いると三次元画像を構築できる。② CLSMは試料が厚くとも連続的に断層像を取り込み、立体再構築でき、薄い断層像も得られる。③一度、連続断層像を得ると、さらに任意の深さ、厚さ、位置および方向にて立体像を作成できる。すなわち血管の連続性を解明するには適している。④臓器形態の解明



に、血管の分布と同時に細胞外基質の三次元的な局在も構築可能である。⑤ CLSM の断層像は数値化され記録が容易で、画像処理や測定にも適している。⑥多数の画像処理用ソフトウェアにより投影、ステレオペア作成、立体回転像などが自由である。⑦生きた細胞のミトコンドリア、ゴルジ装置等を選択的に蛍光染色し内部構造の観察が可能で、細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度、pH、膜電位等も細胞内動態としてとらえられる。

本研究では画像を中心に新生血管の評価を走行から、壁構成細胞の評価まで行うため、過去からの光学像を利用しているものの、以 CLSM 等を利用することにより高次元化を可能にしており、独創的な先駆的な研究になると考えた。

### 社会的意義と社会的貢献度および研究成果の実用化への見通し

虚血性心疾患に対する血管新生療法として、TMLR、血管新生因子、遺伝子導入などが研究され、その優劣が話題になっている。標本内の血管は容易に示せるが、新生されたことを直接的に証明することは困難である。そこで、既存の血管から新生していることを三次元的に示すことが可能であれば、血流のない管腔形成なのか、機能している新生血管かの区別も可能であり治療効果の判定に貢献でき、社会的意義も大きいと考える。内腔が連続していない管腔は造影されないが、内皮細胞を特異的に染色することにより CLSM では描出可能である。現在、血管新生療法の優劣判定が重要かつ緊急性を有する課題であることは明白である。すでに CLSM は心臓発生学では多用されており、内因性サイトカインによる血管新生の観察を行ってきた当グループの経験と研究体制から考えて、この課題を克服することは困難ではなく、本研究の実用化の見通しは大いにあると考えた。

### 国内外の関連する研究の中での当該研究の位置づけ

組織内における毛細血管網の分布は①血

管の内腔を色素または樹脂を注入して、②血管壁を構成する内皮細胞、基底膜を観察する、の2種類がある。最近まで、他の組織が付着しない血管の鋳型を走査型電子顕微鏡で観察する(Rummelt V, 1994)のが毛細血管網の観察の主流であった。しかし、内皮細胞に特異的に存在している酵素・マーカーを応用し、また、基底膜のタイプIVコラーゲン、ラミニンを免疫染色しても観察可能である(Connolly SE, 1988)。CLSMでは単に毛細血管網が立体的に観察できるだけでなく、蛍光多重染色法を併用することにより、毛細血管網と他の要因との関連性を三次元的に捉えることができ、本法によって今後血管新生過程や心筋の機能発現における毛細血管網の役割が明らかにできるものとする。血管新生療法の優劣について比較検討された研究は少なく、興味深い知見が得られるものと期待される。

### 本研究の着想に至った経緯・準備状況等について

1992年に Yanagisawa-Miwa が Science に心臓における血管新生に関する興味ある論文を報告して以来、心臓外科学領域では、虚血性心疾患を治療するのに最も効果的な血管新生療法を求めて研究に力が注がれてきた。Folkman Jらの鶏卵尿漿膜および家兎角膜に線維芽細胞増殖因子(bFGF)を用いた血管新生実験は血管の無いところに血管を誘導あるいは血管新生を促進しており直接的に新しい血管が形成されることが証明された。しかし、他の *in vivo* 実験、特に心臓における TMLR あるいは血管新生因子を導入した研究では心機能の改善、胸痛減少など、また組織所見でも虚血心モデルにおいては bFGF の細胞保護効果で既存の血管が残存しているのか、心筋が萎縮して単位面積あたりの血管数が相対的に多くなっているのか、本当に新生しているのかの区別が可能ではなく、間接的な証明しかなされていないことが問題であった。

心筋に伴走する毛細血管を高圧水注入にて刺激したところ、心筋内に血管と交通し

ていない空洞が多数形成され周囲に管腔形成されたが内腔に血球を認めなかった。すなわち TMLR を用いなくとも瘢痕組織の少ない管腔形成が観察された。虚血心モデルにて未分化な細胞を含む骨髓組織を播種したところ血管新生が起こる可能性が示唆されたため、心筋梗塞モデルに Noshiki Y らの骨髓採取方法(Nat Med, 1996)にて骨髓組織を虚血心筋モデルの心筋内に播種したところ、注入腔の縁に内皮細胞が増殖し、抗 bFGF 抗体陽性に染色されたが、これでは内皮細胞の増殖のみが観察され、"機能する新生血管"とはいえなかった。創傷治癒における血管新生を Rabbit ear chamber (REC)モデルにて生体顕微鏡下で観察したところ、血管新生の初期は sprout が静脈側から形成されることが観察された。このモデルではサイトカイン、抗血小板剤をもちいた薬剤負荷試験、高血糖ラビットなどの、経時的な観察が画一に行えることで優れていることが示唆された。

共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)は急激な進歩を遂げ、1980年代後半から医・生物学領域にての有用な手段となり、今後さらに重要性が増すことが予想されている。血管の連続性、新生過程、細胞外基質との関係等、血管新生において三次元的に解明しなくてはならない項目は多数あり、この度用いる手段として適していると考えた。

## 研究計画

平成 13, 14, 15 年度の 3 年間で研究を予定した。

### I. 実験モデル

- ①腸管膜における毛細血管網：全身麻酔下を開腹した家兎およびラットの腸管膜にある毛細血管網を剥離する。生体顕微鏡下でリアルタイム、直視下に観察可能である。
- ② Rabbit ear chamber (REC)モデル：浅野らの方法に基づいて、家兎の一耳介に一個、パンチで直径 6.4mm の穴をあけ、付着する結合組織を残し周囲の皮膚を数 mm 剥離除去する。アクリル板の台と雲母板の

蓋とで形成される観察窓を装着する。装着してから1週間で血管新生が開始し、3,4週間で動静脈が分化し始める。

- a. 対照：血管成長速度は REC 辺縁の 6 カ所での血管侵入長を測定する。
  - b. bFGF：bFGF が結合組織の膠原線維に吸着する性質を利用し、REC を閉じるときに創に recombinant bFGF 100. g/0.1ml を散布する。
- ③心筋梗塞モデル(全身麻酔下に雑種成犬の左冠動脈前下行枝を第二対角枝を出した遠位で結紮し、不整脈のないこと、左室が拡大しないことを確認し閉胸する。慢性生存犬として飼育し、2 週間目、1 ヶ月および 3 ヶ月目に試料を採取し、観察する。)
- a. 対照：冠動脈結紮のみで閉胸する。
  - b. 高圧水鉄砲による生理食塩水心筋内注入：MadaJet XL (Mada 社製、USA)を用いて生理食塩水 0.1ml を心筋梗塞と正常心筋の境界部を中心に直径 1cm の大きさに噴霧する。冠動脈等血管を貫通すると出血するので、止血する。
  - c. 骨髓組織注入：雑種成犬の腸骨上前腸骨稜より骨髓組織を採取し、注射器で b)と同様に境界部に注入する。

## II. 負荷試験

- ①血管平滑筋作動物質の局所投与：I-①および I-② a において生体顕微鏡下で直視下リアルタイムに観察できる利点を生かす。ノルアドレナリンを点滴静脈注射する。終末細動脈が収縮すると血管壁にある血管平滑筋が敷石状に連なる。
- ②血栓塞栓モデル：I-② a のモデルにおいて微小塞栓物質で血栓を作成する。生体顕微鏡下で血栓を流し、細動脈、細静脈、毛細血管網に血栓塞栓が形成されるとき血流方向、血流、AV shunt 形成を観察する。さらにヘパリン、ウロキナーゼ等を静脈注射し、血栓溶解に伴う変化を観察するのを目的とする。
- ③ステロイドによる影響：I-② a において REC 装着時からステロイドを投与し、新生血管の chamber 内の出現、血管伸長速

度、細動・静脈への分化時期、微小循環系の完成時期を I-② a および I-② b と比較を行う。また、血管密度、血管径、血管運動、循環動態なども検討するのを目的とする。

### III. 評価方法

- ① 生体顕微鏡下観察：I-①および I-②を写真に、またビデオに撮影し、得られた画像はパブリックドメインソフトの NIH Image を用いて血管密度、血管径、血管長等を解析しする。
- ② 生体蛍光色素染色による平滑筋細胞の配列走行の観察：生体顕微鏡のステージに I-①を固定し、灌流液中に Rhodamine 123 10mg を加え、30 分間留置しその後洗浄する。落射蛍光装置を用い、蛍光像を CCD カメラで観察し、ビデオに収める。終末細動脈の核の周囲に密なミトコンドリアの分布が観察され、その分布から細動脈血管における生きた細胞の形態学的観察および血管平滑筋細胞構築の解析が可能である。
- ③ 共焦点レーザー顕微鏡での観察
  - i. 蛍光標本作成：実験モデル I-①-③から観察用の試料を切り出し、2%ホルマリンで 5 分間固定し、1mg/ml Dispase で 37°C、30 分間の酵素処理を行い、再固定する。細胞膜除去は 0.2% NP-40 で行う。B 励起像として fluoresceing phalloidin にてアクチン線維を、G 励起像として anti-smooth muscle myosine antibody (rabbit, affinitly purified)、および 蛍光標識抗体 rhodamine-labeled anti-rabbit Ig antibody (goat) を用いた間接蛍光抗体法にて平滑筋ミオシンを染色し、蛍光二重染色とする。
  - ii. 血管鑄型標本作成：蛍光標識ゼラチン溶液を I-①および②では動脈に、II-③では摘出心臓の冠動脈に注入し、氷冷した生理食塩水に浸し、ゼラチンをゲル化させる。ゼラチンがゲル化したら試料を切り出し固まった状態でホルマリン固定する。この方法では II-③において冠血管に

連続していない管腔は標識されない。

- iii. 画像処理：奥行き方向に 1. 毎に断層像を得て、記録する。
- iv. 画像の再構築：三次元データセットからステレオ視像、アニメーションを作成する。ステレオ視像を作成するには得られた終末細動脈他のデータセットから、細動脈の血管壁平滑筋配列の三次元的な表示を再構築する。I-③ b および c では注入腔に対して垂直に流入する血管網の観察に特に重点を置く。
- ④ 組織学的検討：I-③の標本は一部を通常の染色を行い、さらに抗 bFGF 抗体を用いた免疫染色を行う。

### 研究成果と参考論文

この報告書の研究成果としてまとめた『虚血心筋への血管新生因子を用いた血管の誘導』は血管新生因子を用いて血管誘導を行い形成された血管の観察を述べた。『血管新生療法（レーザー心筋血行再建術）』では歴史および作用機序、臨床治験結果をまとめた。『血管新生の速度；創傷治癒において血管新生を促進する条件』では血管新生を細胞外環境を整えることにより促進し考察した。

参考論文としては臨床家として、研究者としての考えを示すことを目的に、現在我々が日常的に遭遇する心臓外科領域、高度医療を必要とする人工臓器領域についての問題点を考慮し、今後の方針を示した。

### まとめ

この度は『虚血心筋への血管新生因子を用いた血管の誘導と画像三次元構築による壁構成細胞の評価』の研究を行ったが未だ解明されていない分野であり、さらに研究を進めていきたい。



## 虚血心筋への血管新生因子を用いた血管の誘導

東京女子医科大学心臓血管外科 遠藤真弘

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。図 4 では REC モデルの血管伸展 (左)、血管芽 (sprout) の観察 (中: ↑)、人工真皮に侵入する血管 (右) といった画像がえられている。

血管芽 (sprout) は条件が整えば顕微鏡下にしかりリアルタイムに観察することが可能である。繊維状アテロコラーゲンを足場としたときに多数観察できた (図 5)。ゲル状アテロコラーゲンを足場とした場合には先端の尖った血管芽が伸展するのを観察できた (図 6)。

増殖因子の影響下の血管新生を定量化することを試みた。REC モデルにリコンビナント bFGF を用いたときの創傷治癒に伴った血管新生を 3 群 (B1:bFGF 6. g、B3:bFGF 18. g、対照:生食) において観察した (図 7)。

リコンビナント bFGF の効果を認め (図 7 :B1)、統計解析によっても施行後 1 週間後までは対照に比べて優位に新生が進行したが、2 週間後には差が出なくなった (図 8)。施行後 5 週間での血管密度にも全く差は認められなかった (図 9)。

血管新生を速やかに進行させるためには細胞外環境を整えることが重要である。線維状に成形したアテロコラーゲンを足場として REC 内に留置したところ、血管芽 (sprout) を多数観察することに成功し、その速度を測定したところ約 0.1 mm/日であった。ところが、虚血心筋は血流が少なく、代謝が良好に行われていない。すなわち細胞外環境が良好ではなく、良好な細胞外環境を整えるにはまず、血流を増加しなければならない。すなわち血管が誘導されなければならないといった悪循環である "Vicious cycle" に落ちいつている。この悪循環から抜け出さないことには血管新生治療は成功しない。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。この患者において下肢の阻血状態が改善されていた期間があったとしても短く、新生した血管を良い状態で保つことはできなかった。その結果、患者の下肢は切断となっている。

本研究課題において解決しなくてはならない問題はたくさんあるが、解決に努力したい。

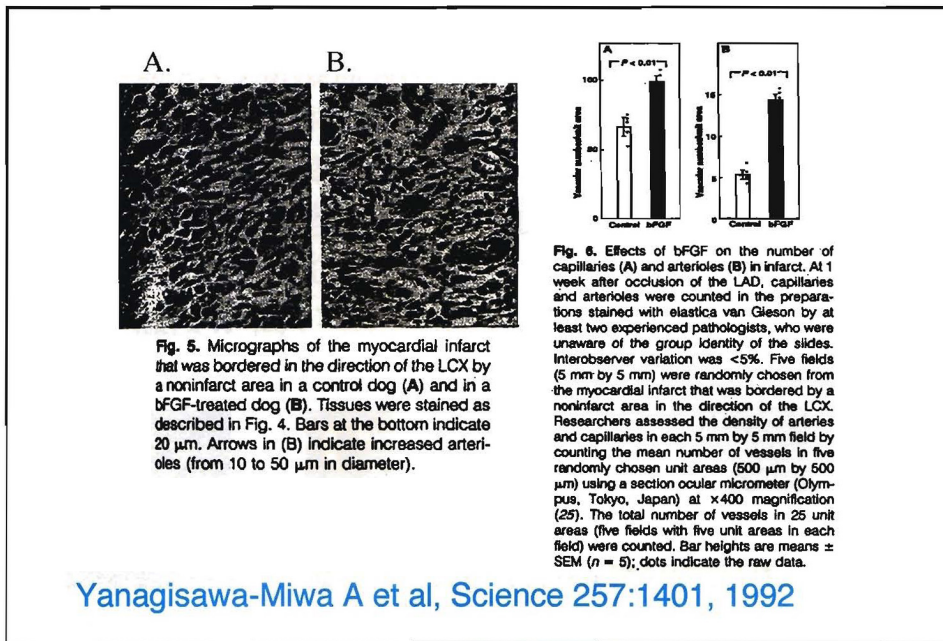


図1 虚血性心疾患の血管新生療法はこの報告から始まった

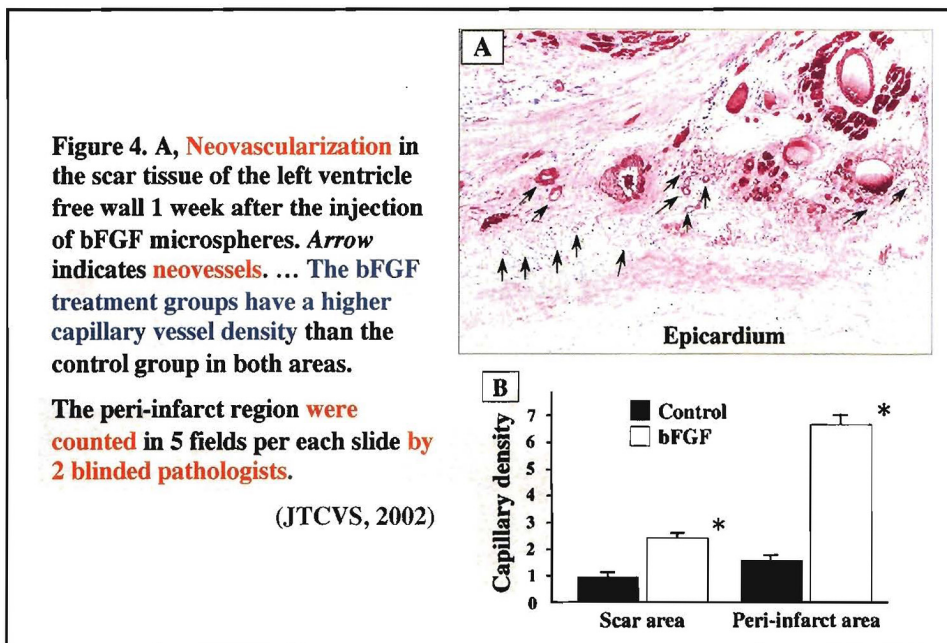


図2 血管新生の証明が正しくなされなかった

### 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

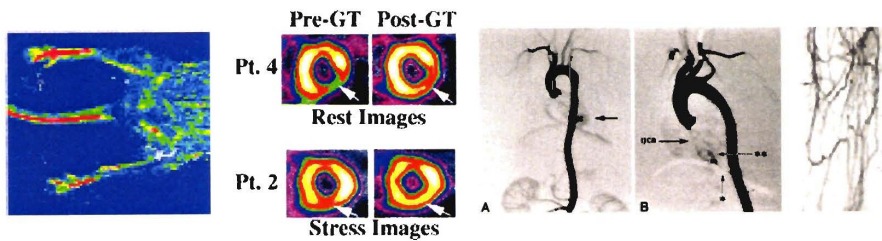


図3 新生血管の間接証明

### 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



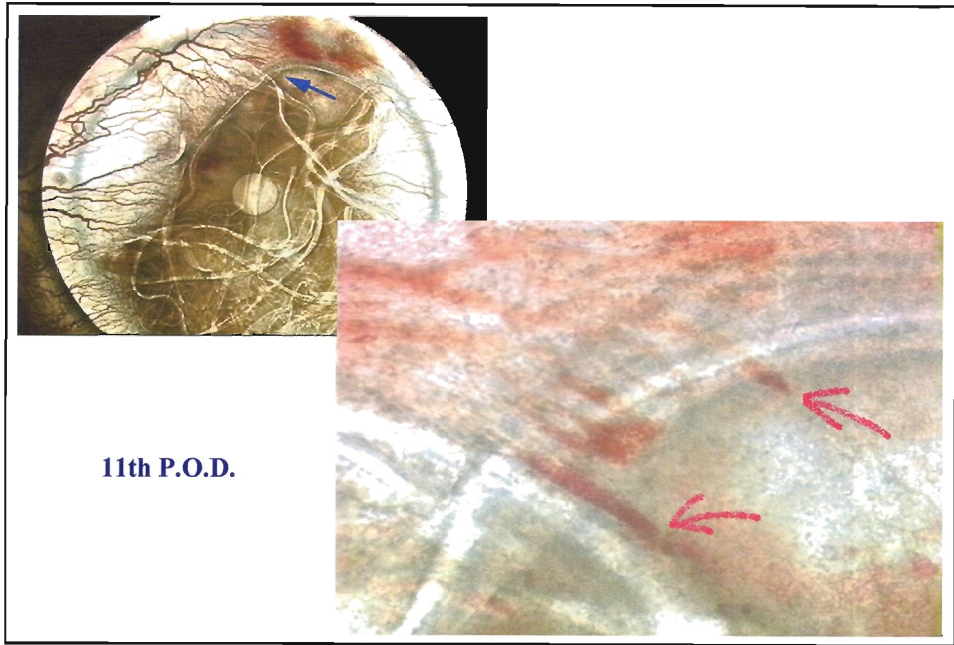


図5 繊維状アテロコラーゲンを足場としたRECの術後11日目  
REC全体（左上）と拡大（右下）。左上の矢印の位置に  
血管芽（右下：↓）が多数観察された。

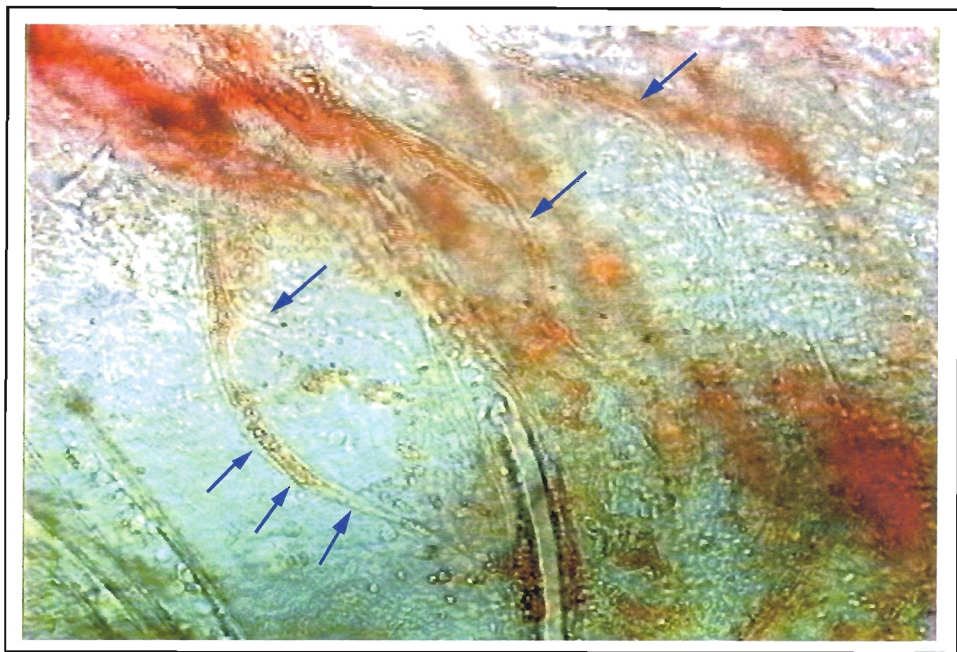


図6 ゲル状アテロコラーゲンを足場としたRECの術後7日目  
尖った形のsprout（↓）が多数観察される。

# RECにおける血管新生の過程

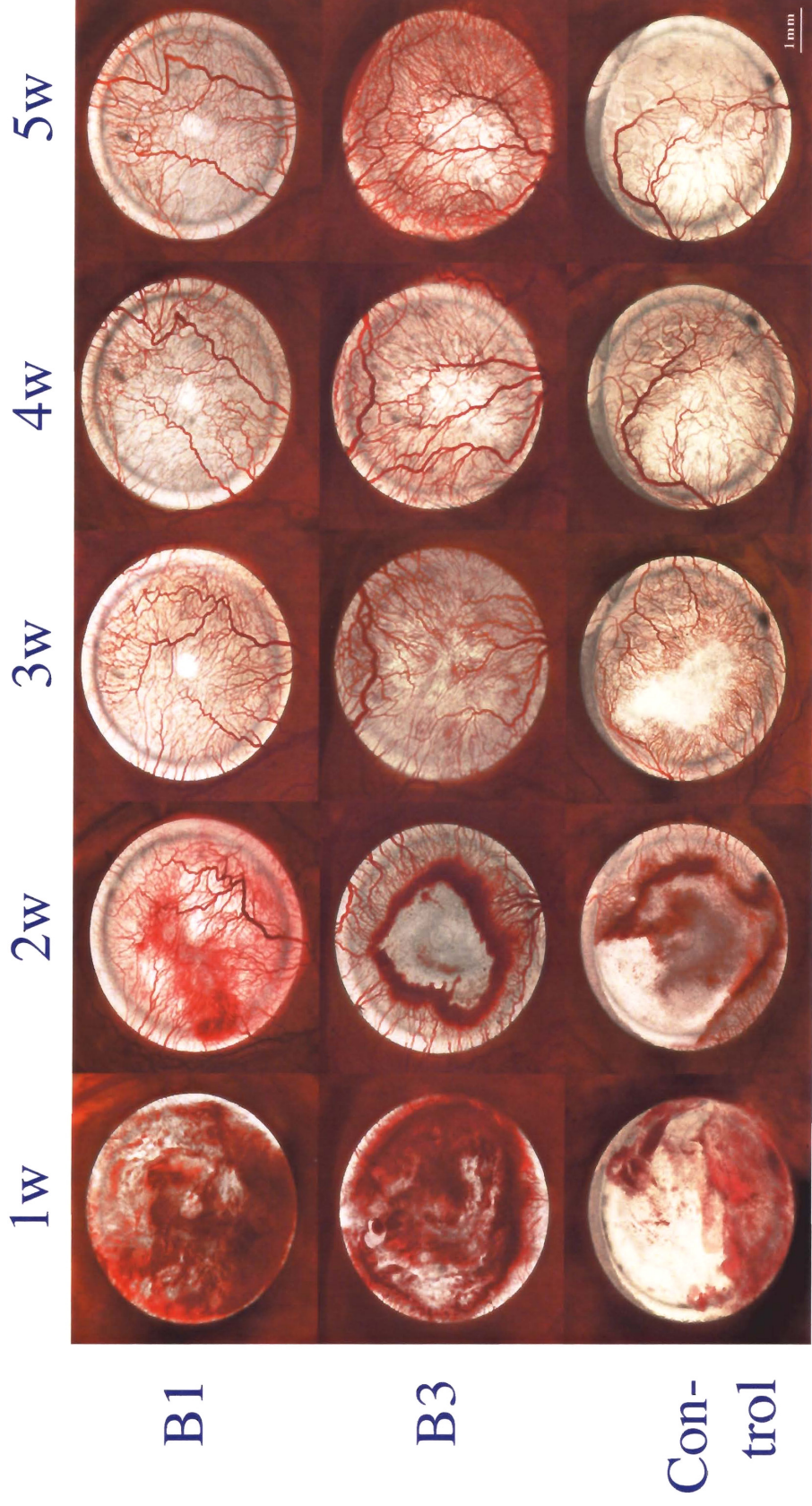


図7 リコンビナントbFGFを用いてのRECでの血管新生効果



## Comparison of Newly Vascularized Area

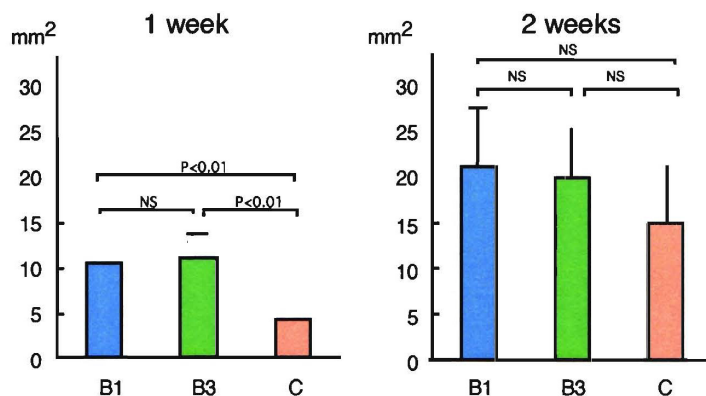


図8 リコンビナントbFGFを用いての創傷治癒における血管新生

## Vessel Density at 5th Week

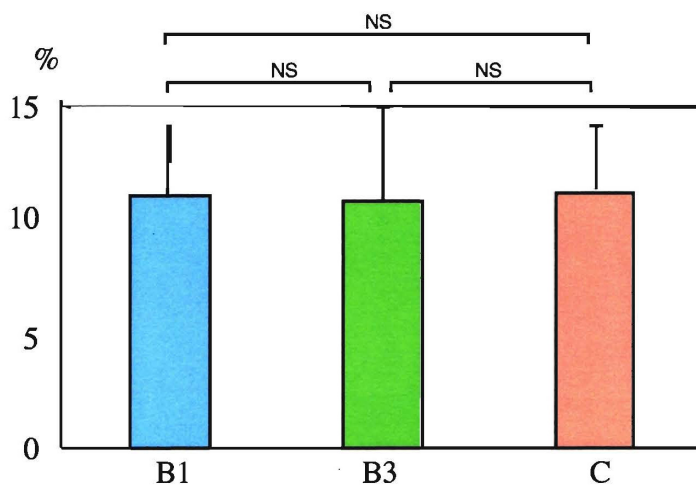


図9 リコンビナントbFGFを用いても血管密度は増加しない

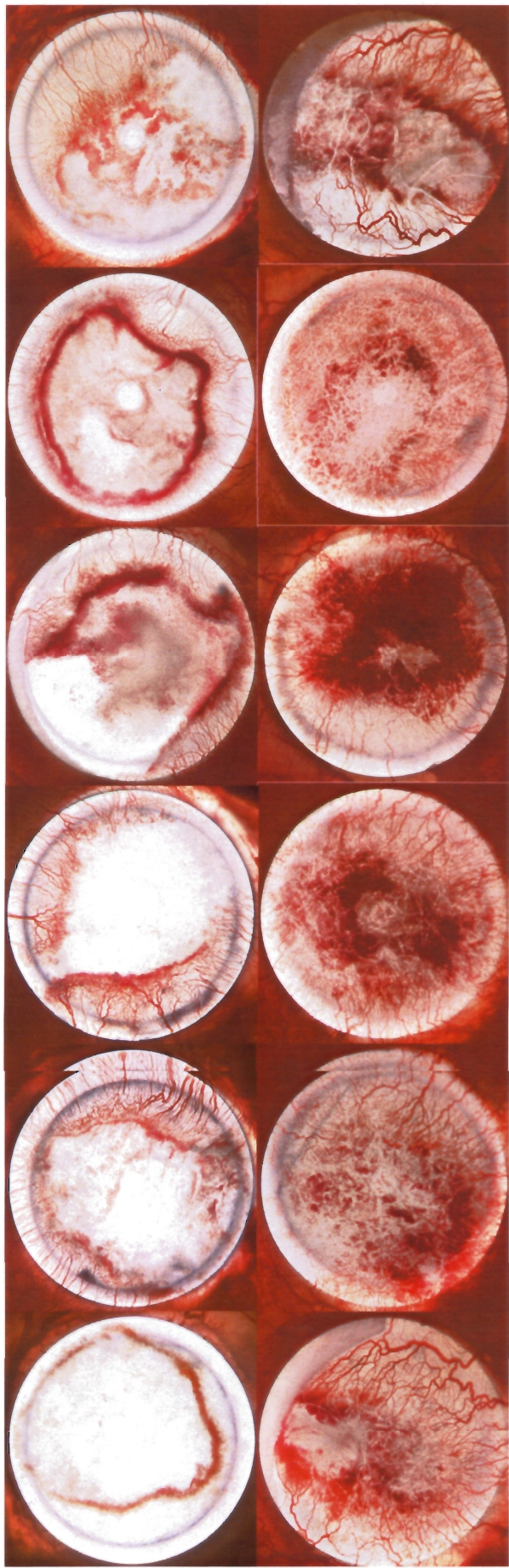
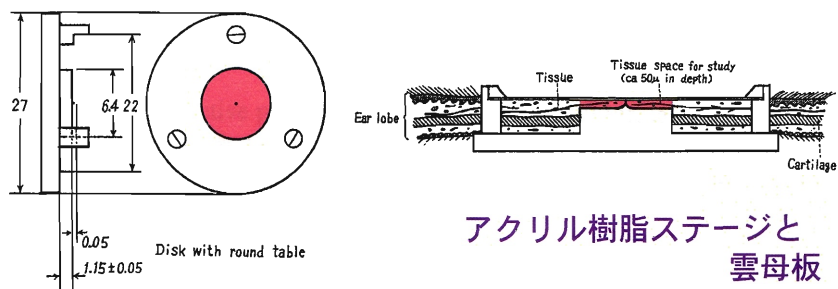


図1 RECのマクロ写真 作成後2週間

REC作成のみのControl群 (上段) およびRECに足場として綿状コラーゲンを留置した群 (下段)

**Rabbit Ear Chamber による微細循環動態の  
研究法について**



浅野牧茂ほか. 生体の科学. 13:285, 1962

図1 Rabbit ear chamber model



**血管新生過程の観察  
-NDフィルターの利用による観  
察域の拡大-**

Kodak Wratten gelatin filter  
No. 96, N.D. 0.30,  
露光増加量+1

鈴木豊ほか. 呼吸と循環  
51:507, 2003

図2 NDフィルターの利用



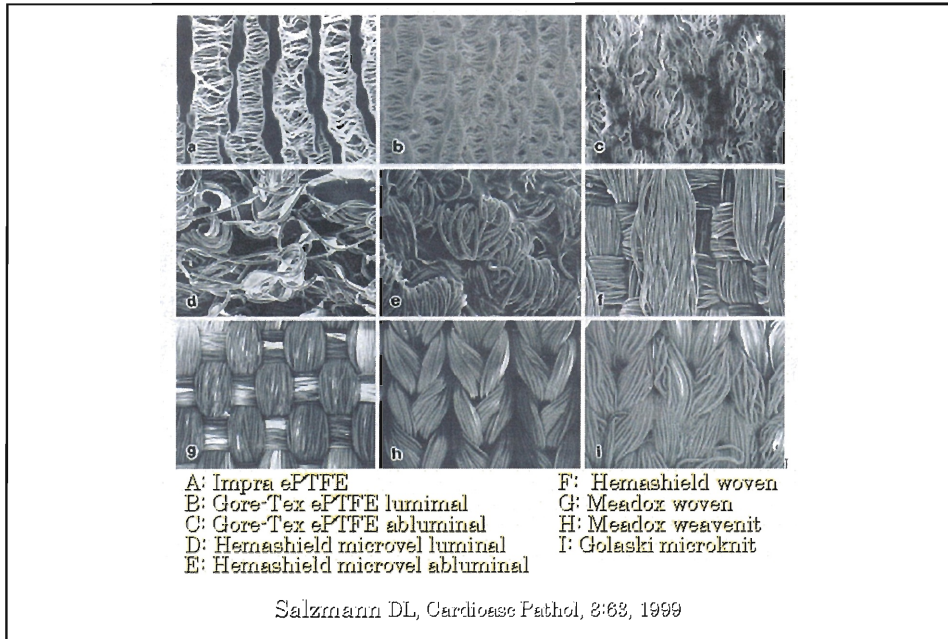
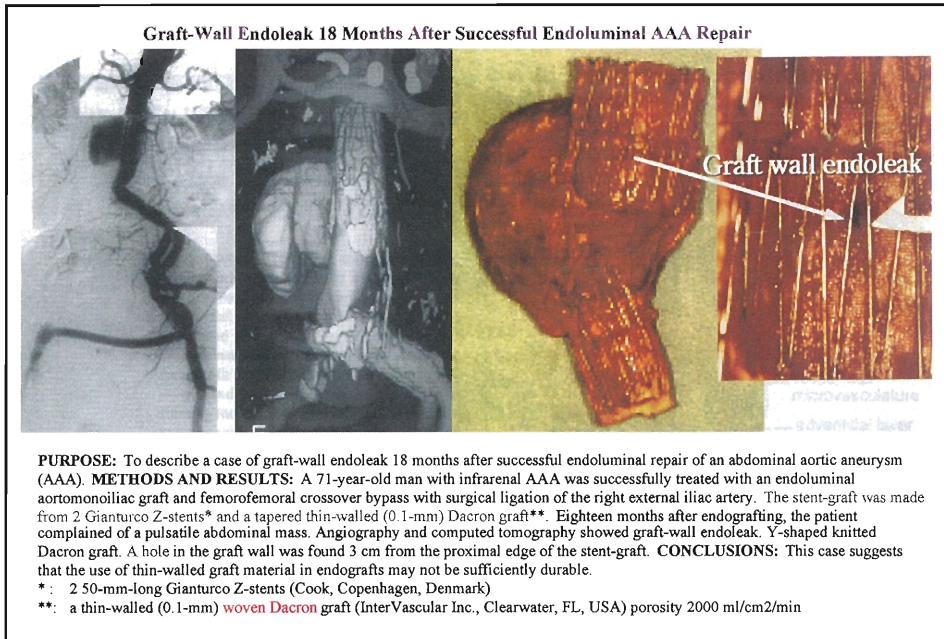


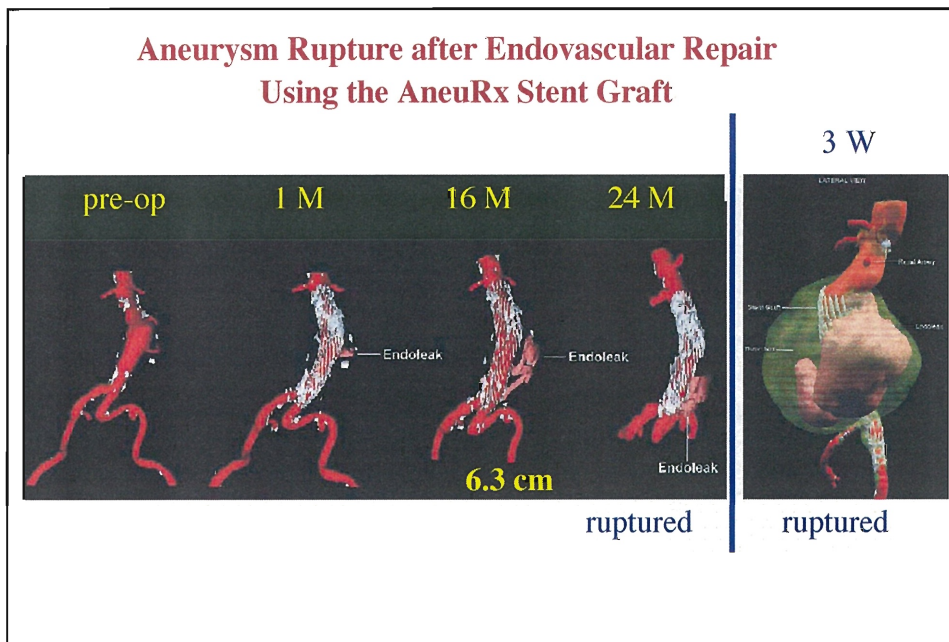
図1 Vascular grafts in the Market



図2 人工血管の種類 (Blood Access用)



Midorikawa H et al. J Endovasc Surg. 6:251, 1999



Zarins CK et al. J Vasc Surg. 31:960, 2000

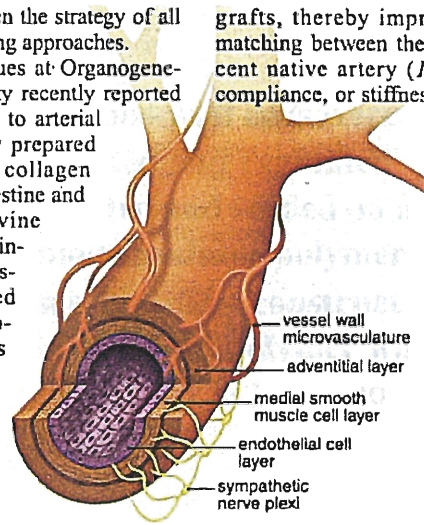
## Replacement Arteries Made to Order

L.E. Niklason

Fig. 1. Normal arteries are composed of three component layers: the inner endothelial layer, the intermediate medial layer, and the outer adventitial layer. The endothelial cell layer is composed of a monolayer of confluent cells that prevents thrombosis and regulates vascular smooth muscle cell tone. The medial layer is composed of alternating microlayers of smooth muscle cells and extracellular matrix components arranged around the circumference, which confer much of the mechanical integrity to the artery. The adventitial layer is a loosely organized connective tissue that contains fibroblasts and matrix proteins, and is the source of the microvasculature and sympathetic innervation that sustains the muscular artery wall.

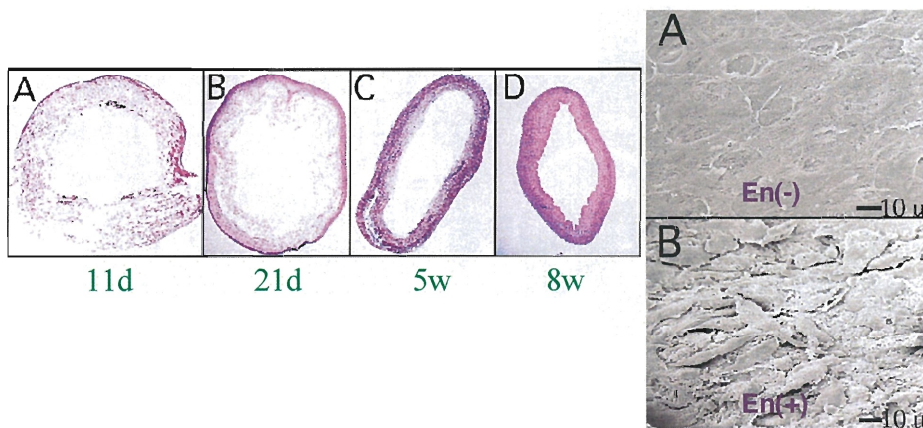
been the strategy of all  
ring approaches.  
argues at Organogene-  
sity recently reported  
ch to arterial  
ey prepared  
al collagen  
ntestine and  
ovine  
ie in-  
vas-  
ated  
iko-  
his

grafts, thereby impr  
matching between the  
cent native artery (I  
compliance, or stiffnes



Niklason LE, Science, 286:1493, 1999

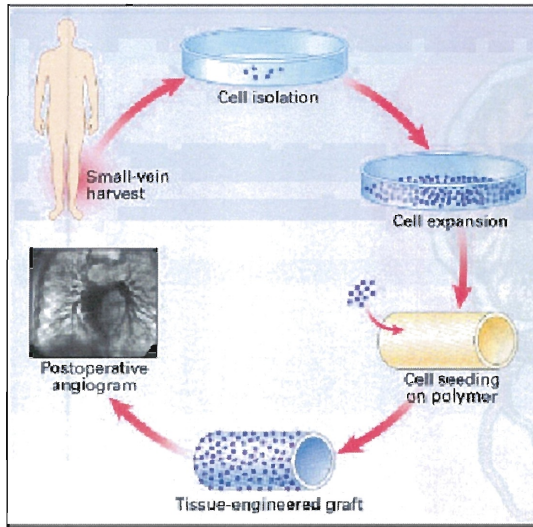
## Morphologic and Mechanical Characteristics of Engineered Bovine Arteries



Niklason LE et al. J Vasc Surg. 33:628, 2001



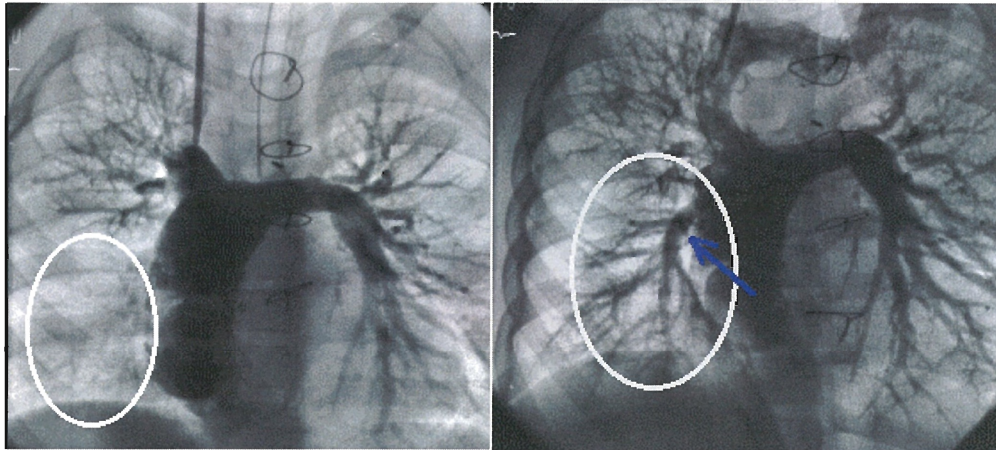
## Transplantation of a Tissue-Engineered Pulmonary Artery



Venous-wall cells were isolated and expanded in vitro and seeded on a biodegradable polymer scaffold. The construct of cells and polymer was implanted as autologous tissue.

Shin'oka T, N Engl J Med 344:532, 2001

## ティッシュエンジニアリングによって作製されたグラフトを用いた肺動脈再建



術前

術後

日比野成俊、他. 胸部外科. 55:368, 2002



人工血管置換術 by Dr. 末次文祥 (2002. 1)