

リコンビナント bFGF と線維状アテロコラーゲンの足場  
による血管新生と組織再構築

(課題番号 14571161)

平成14, 15年度科学研究費補助金 (基盤研究C)  
研究成果報告書



平成16年3月

研究代表者 楠元雅子

(東京女子医科大学循環器内科講座 教授)



リコンビナント bFGF と線維状アテロコラーゲンの足  
場による血管新生と組織再構築

(課題番号 14571161)

平成14, 15年度科学研究費補助金 (基盤研究C)  
研究成果報告書

平成16年3月

研究代表者 楠元雅子

(東京女子医科大学循環器内科講座 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 .....	7
2. リコンビナントbFGFと線維状アテロコラーゲンの足場による 血管新生と組織再構築 .....	1 1
3. 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 .....	2 3
4. Macroscopic sequential pictures of angiogenesis in a rabbit ear chamber .....	3 1
3. 参考論文	
1. EPTFE人工血管に発生するseroma対策 .....	3 7
2. Angiographic findings and surgical treatments of coronary artery involvement in Takayasu arteritis .....	5 5
3. Reconstruction of left ventricle in patient with cardiac hemangioma at apex .....	6 3
4. Acute occlusion of coronary artery bypass graft with nonionic contrast medium .....	7 3
5. 心疾患女性の妊娠はどこまで可能か .....	8 1
6. 弁膜症診療の進歩 弁膜症と妊娠・出産 .....	8 7
7. 主要疾患 現況・病態・診断・治療 心房中隔欠損 二次孔 .....	9 1
8. 本態性高血圧症患者に対するニルバジピン（ニバジール）の 運動負荷試験における血行動態ならびに内分泌因子 への影響 .....	9 5
9. 医師が患者になったときの冠動脈バイパス術；遠隔成績 .....	1 0 5

## はしがき

東京女子医科大学循環器内科 楠元雅子

大学病院の診療に携わる医師は、臨床、教育、研究の3本柱をすべて同時にこなすことが要求されている。私は東京女子医科大学を卒業後、母校に就職したが、この2004年3月で定年退職する。医師になってからの40年間で振り返って、この3本柱を均等の高さに立て屋根をのせられたかと改めて考えてみた。まずは必死に患者さんを教科書として病棟で臨床を学び、臨床的研究で医学博士号をいただいた。その後循環器内科の外来や健康診断の生活指導を行い、臨床では柱は1本立てられたと思っている。

1990年、東京女子医科大学は自学自習の精神を尊ぶテュトリアルや、基礎と臨床の枠をはずし全人的な統合的診療を目指した新しい教育システムを導入した。それに伴い数多くの教育委員会が作られ、私はそのいくつかの委員会の委員として基礎作りに参加できた。また臨床技能の評価としてOSCE (Objective Structured Clinical Examination、客観的臨床能力試験)を5年生および6年生に施行でき、カリキュラムの中に組み込むことができたこと、医学部学生の部活動としてSP (Simulated Patient、模擬患者)研究会を創立できたこと、など教育に関しても柱は立てられたと自負している。

最後に研究であるが、臨床的研究は別として、基礎的な研究に関しては若い医局の先生方の力に頼っていた。特に富澤康子助手、極めて熱心で斬新なアイデアの持ち主の研究者と巡り合い、基礎的であり、その成果を臨床に反映できる地道な研究活動に励んでくれた。私にとって恵まれたことであったが、自分自身の研究としてみても、研究の柱はかなり低く、屋根は傾いていると評価している。

しかしながら臨床医としては、臨床の他にどれか1本の柱がしっかりと立てられれば大学病院でも合格点は与えられて良いのではと私自身は思っている。

患者さん中心の良い医療をめざして、患者さんに教えられ、教職であったことの喜びを感じさせていただきながら定年退職を迎えられたことは非常に幸せであり、周りの方々に感謝の気持で一杯である。若い人々の今後の活躍に期待し、素晴らしい成果を待ち望んでいる。

1. 研究課題名：研究組織・研究経費・研究発表

【研究課題名】

リコンビナント bFGF と線維状アテロコラーゲンの足場による血管新生と組織再構築

研究課題番号 14571161

【研究組織】

研究代表者 楠元雅子（東京女子医科大学循環器内科教授）

研究分担者 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 14 年度 2,500 千円

平成 15 年度 1,500 千円

計 4,000 千円

【研究発表】

著書・論文

1. 楠元雅子：妊娠と心臓病 心疾患女性の妊娠はどこまで可能か、Cardiovascular Med-Surg, 4:181-185, 2002
2. 楠元雅子：弁膜症診療の進歩 弁膜症と妊娠・出産、Cardiac Practice, 13:33-36, 2002
3. 楠元雅子：先天性心疾患における心不全、実地診療に即した心不全診断・治療マニュアル、高野照夫、清野精彦編、医療ジャーナル社、東京、2002、p150-156
4. 楠元雅子：SP との出会い、ヒューマン・リレーションズ学習、東京女子医科大学ヒューマン・リレーションズ委員会編、篠原出版社、東京、2003、p101-109
5. 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
6. 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.
7. 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
8. 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
9. 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
10. 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.
11. 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.

12. 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
13. Endo M, Tomizawa Y, Nishida H. Bilateral versus unilateral internal mammary revascularization in patients with diabetes. *Circulation* 2003; 108:1343-9.
14. 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
15. 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
16. 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
17. 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、VIII. 狭心症の臨床、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
18. 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-一期的か二期的か、off-pump か on-pump かの選択、胸部外科、56:619-625, 2003
19. 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
20. 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
21. 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
22. 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
23. 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
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; 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
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. 芝田高志、富澤康子：超高分解能 X 線断層撮影法による動脈硬化症に於けるヒドロキシアパタイト結晶の 3 次元的成長形態に関する研究、p37-41、(財)日本心臓血圧研究振興会、平成 13 年度研究業績集
32. 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
33. 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：21 世紀の冠動脈疾患の治療戦略 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
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

## この度の研究計画及び成果の概要

東京女子医科大学循環器内科 楠元雅子

### 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、この研究を始めるにあたっての背景および位置づけについて明らかにし、研究計画および成果のエッセンスを簡単に説明する。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り、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、また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と期待されている。自然には再生しない/できない臓器、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、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。また、組織再構築に伴う血管新生において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することである。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す。

細胞、細胞外マトリックス、増殖因子がすべて存在しないと治癒は促進しないため、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といった重要な役割を司っている。初期における足場は細胞外マトリックスの役割を演じるが、生体内での役割が終了した後は吸収され、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 bFGFを一時的、あるいは徐放するよう、または内因性サイトカインが吸着/徐放するように使用する。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できる。

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ために大いに貢献するものと考えている。またこの研究は、将来への発展を目指しており高機能化への基礎ともなりえ、苦しんでいる難治性治癒不全の治療の進歩に大いに貢献し、患者の苦痛を軽減することを可能にすると考えた。

### 当該研究の学術的な特色、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積極的に組み込むことによって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、生体吸収性材料の線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 bFGF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/徐放するように利

用した。すなわち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った。この研究は以上の独創的な点を多数含んでおり、結果が得られれば、新しい治療法へと発展させられ大変役に立つと考えた。

臨床においてこの種の研究領域への要求度は高く、重要かつ緊急を有することは明白な事実であった。最先端の学問である組織工学にオーソドックスなRECという透明窓モデルを採用したが、現代科学の強力な武器になれるリコンビナント bFGF 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ることとしたが、この課題を克服することは、循環器・人工臓器の研究を行ってきた我々の経験および、これまでの研究成果から考えて困難ではないと考えた。

### 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個体レベル(クローン)、②臓器レベル、③組織レベルの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る。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、商品化されている。

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緒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

最近盛んに行われるようになった血管新生療法は動物実験と実際の臨床の結果では大きく異なっていることが知られている。これは血管新生療法における血管の観察が直接的ではないことが多いからである。

胚性幹細胞(ES細胞)由来の Flk-1 (VEGFR-2)陽性細胞が血管を構成する内皮細胞と壁細胞(血管平滑筋細胞、周皮細胞)の双方に分化、ES細胞由来の“血管前駆細胞”が *in vitro* および *in vivo* で血管構築を再構成できることが報告されている。内因性サイトカイン活性型人工血管植え込み後の治療過程においてしばしば円形の幼弱内皮細胞を観察し、人工血管壁を内皮細胞が管腔形成して内腔面に上昇していくのを観察した。

原始的な血管叢からの血管新生には出芽(sproutingあるいは budding)と嵌入(intussusceptionあるいは non-sprouting)が報告されている。RECモデルにおける血管新生の過程において血管芽(sprouts)をしばしば観察する。動脈と静脈への分化の可能性を秘めた血管芽を形成するのが血管前駆細胞であるならば、採取した血管芽を血管再生医療へ応用できるのではないかと考えた。

外科領域の再生医学における増殖因子の利用、細胞移植の応用範囲は多岐にわたっており、今後の治療成績を向上させるには、患者自身の細胞を生体適合性の良好な足場を用いて *in vivo* 培養することが好ましく、今後の展開が大いに期待されると考えた。

### 研究経過について

組織や臓器を再生させるために本研究では『細胞、足場、増殖因子』の3要素の組み合わせに焦点を絞った。RECモデルでは足場を賦与しなくても自然のフィブリンに宿主の線維芽細胞が付着し、増殖する。足場はコラーゲンを用いることにしたが、コラーゲンの形状【アテロコラーゲンを線維状にしたもの、ほぐしていな

い微細線維状のもの、シート状に加工した】の3種類を preliminary study にて細胞親和性を評価したところ、細胞親和性には優劣があることが明らかになった。アテロコラーゲンを線維状にしたものでは、植え込み後4日目には円形細胞が周囲に出現し、線維の表面への細胞の付着が認められ、4週間目には線維が細くなり、その上を乗り越える血管が観察された。新生血管が行く手を妨害されずに足場を乗り越えるということは親和性が良好なことを示している。ところが微細線維性では足場まで到達した血管はそれより先に進まず、先細りしていた。シート状では表面に細胞の付着が認められたが、良好な親和性とは認められなかった。血管新生因子はリコンビナントの bFGF を用いるが、これが足場のコラーゲンに吸着そして徐放といった足場の DDS 効果が期待されている。血管新生を伴った組織再構築のための preliminary study は順調に進んだ。さらに、臨床応用するためのデバイス化技術等についてもデザインしなければならないと考えた。

## 研究成果

再生医学では自分の細胞を増殖させ、組織を形成し、自分の臓器などを再生させるのが最終目標である。この REC モデルの二次元の観察窓の新生血管の層を筒状に丸めて組織工学的に作成した人工血管の最外層にまきつけたら外膜に相当する血管網を形成する可能性も示唆される。アテロコラーゲンの中で患者の軟骨を三次元培養し、患者に戻すというデザインでジェンザイム・ティッシュ・リベラ社が商業化したという報道があったが、我々の家兎における慢性動物実験では *in vivo* 二次元培養ではあるが線維状アテロコラーゲンの足場で、パンチアウトされた軟骨の組織再構築が起こった。科学の力で、将来、人間のあらゆる臓器が再生される時代が来るのも近いと思われるが、我々の研究はその目標の一部に参加できることを願う。

Preliminary study は順調に進んでおり、十分に準備されたと思われた。

## 研究計画

平成 14, 15 年度の2年間で研究することを計画した。

## 材料選択

- ① 細胞 : autologous *in situ*, 培養細胞 (autologous, homo-)、骨髓組織中の細胞等を使用する。細胞の追跡には FITC, DiI, Acridine Orange などの蛍光色素を利用する。
- ② 培養条件: 1) *in situ* (培養せず、周囲の細胞を利用), 2) *in vitro* (普通の細胞培養), 3) *in vivo* (浮遊液を chamber 内に入れ、フィブリン糊でシールする)

## インテリジェント細胞外環境の設計

- ③ 足場: I)あり【線維状アテロコラーゲン】、II)なし、III)足場の上で培養後に chamber 内に入れ使用
- ④ リコンビナント bFGF : i) control, ii) 傷に噴霧 (量は溶液の濃度で調節する)、iii) 足場を bFGF に浸し DDS の条件、iv) 内因性サイトカインの吸着条件。リコンビナント bFGF は市販のトラフェルミン 100  $\mu$ g/ml (科研製薬)を使用する。通常溶解では1回の噴霧で 6  $\mu$ g となる。用量は溶解時の液量にて調節する。
- ⑤ *in vitro* 培養による DDS の徐放効果の評価 : ④ iii)の細胞増殖速度測定

## 動物実験モデル

- ① Rabbit ear chamber (REC)モデル: 家兎の片方の耳介にアクリル板と雲母板の観察窓(直径:6.4mm)を装着するときに①-④までの条件にて組み合わせを行う。術後は作成直後から観察でき、4日目に観察した以降は1週間に1回の観察を行う。

## 血管新生と組織再構築の評価

- ② 血管新生の観察: マクロ写真を撮影し、NIH Image から新生血管面積、血管侵入距離 & 速度を測定する。非侵襲的経時的直視下生体顕微鏡下の観察により、血管芽の形成、細胞侵入、足場上の細胞付着、足場の吸収

具合を評価する。

- ③ 組織再構築の評価：血管、軟骨、皮膚 (preliminary study では足場が良いと5週間で毛の生えた皮膚が皮下結合組織を伴って形成されることを観察した)
- ⑨ 摘出しての組織学的評価：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)を観察する。
- ⑩ 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。家兎では検出できない可能性がある。
- ⑪ 産生されたサイトカインの評価：内因性サイトカイン(bFGF、TGF  $\beta$ 、PDGF を含む)を ELISA 法で測定する。
- ⑫ 血管壁の酸素分圧測定：oxygen microelectrode を用いて REC を穿刺し創内の酸素分圧を測定する。
- ⑬ Nitric Oxide 検出：⑨の組織切片中の NO を Diaminofluorescein-2 を用いて検出する。

## 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『リコンビナント bFGF と線維状アテロコラーゲンの足場による血管新生と組織再構築』は足場と増殖因子の組み合わせに、細胞は in situ で用いた結果であり、血管新生療法の理想に近い。『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』では血管新生の速度を足場の有無で比較し、細胞親和性の良好な足場があると家兎を用いた実験ではあるが、1日に約 100 $\mu$ m 伸展することを示した。『Macroscopic sequential pictures of angiogenesis in a rabbit ear chamber』では血管新生の伸展速度を測定するための基礎となる撮影方法を示した。

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せるものを引用するよう務め、現在臨床で何が問題であるか、また、今後の方針を示すよう心がけた。

さらに我々が日常的に遭遇する循環器内科領域、および心臓血管外科領域、高度医療を必要とする人工臓器領域の症例の治療法についても考察した。循環器内科領域では特に、妊娠の可能性のある心疾患を有する女性の妊娠および分娩に際しての母体および児の危険率や合併症について述べた。

## まとめ

この度は『リコンビナント bFGF と線維状アテロコラーゲンの足場による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現象が多く、さらに研究を進めていきたい。

## リコンビナントbFGFと線維状アテロコラーゲンの足場による 血管新生と組織再構

東京女子医科大学循環器内科 楠元雅子  
同 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。図 4 では REC モデルの血管伸展 (左)、血管芽の観察 (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。

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)。

本研究では 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 $\mu$ g、B3:bFGF 18 $\mu$ 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。血管新生因子を使用する前に細胞が増殖しやすい条件として「足場(scaffold)」に注目した。アテロコラーゲンは細胞親和性が良好であり、線維状になっていると血管芽が乗り越えて伸展する。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 (図 4 中)、その速度を測定したところ約 0.1 mm/日であった。顕微鏡下に観察すると血管芽は比較的丈夫であり、出血することが少なかった。

組織工学の技術を用いて作成した医療用具の問題点は術後の「萎縮」および「瘢痕化」である。この問題を解決するには組織再構築が生体内で起こった後に、組織の血流が十分に保たれ、代謝が良好に行われていることが必要である。そのために組織再構築に際し血管の誘導を試みなければならないと考えている。

本研究から将来への発展性を考えてみると、最初は人工血管の内面を被覆する内皮細胞を誘導し、抗血栓性を高めるのを目的としていたが、次に血管壁の再構築に内因性サイトカインを利用し、本研究では組織レベルから細胞レベルでの細胞外環境を整えるデザインによる組織再構築をめざすことにした。

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。

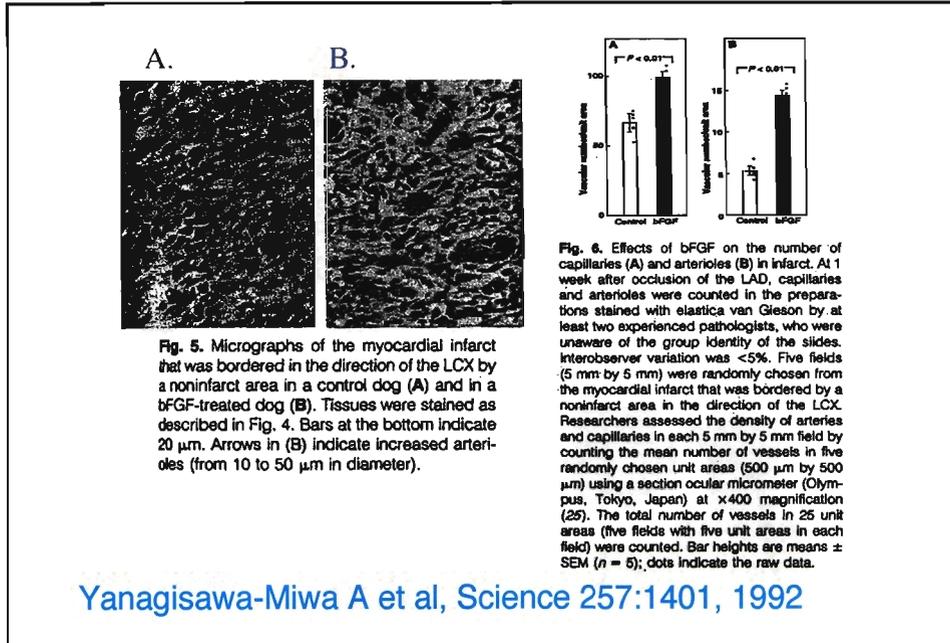


図1 虚血性心疾患の血管新生療法はこの報告から始まった

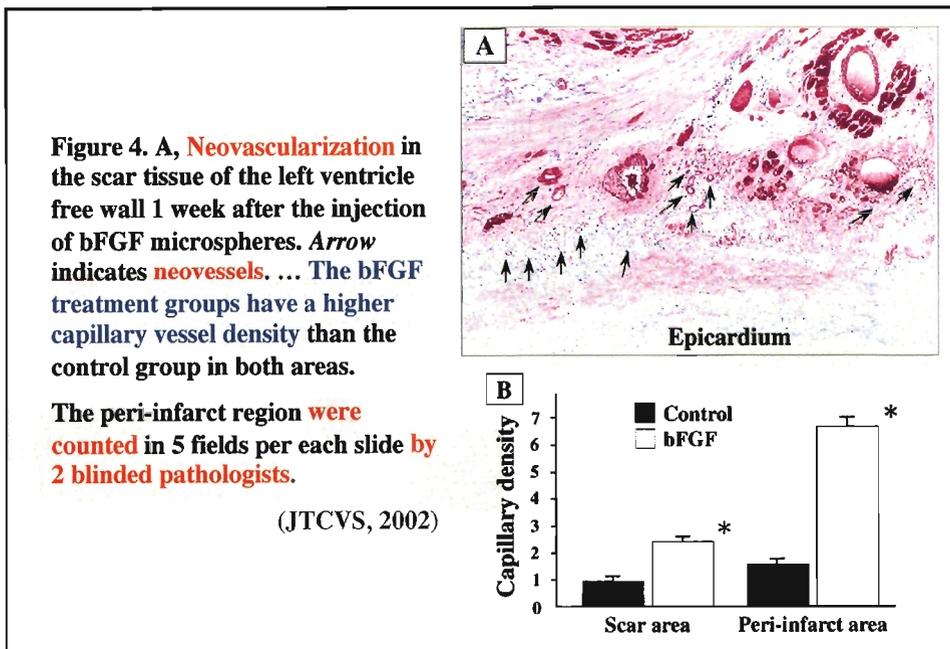


図2 血管新生の証明が正しくなされなかった

### 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

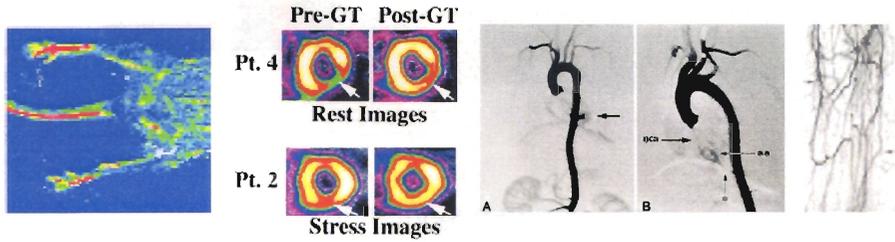


図3 新生血管の間接証明

### 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

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

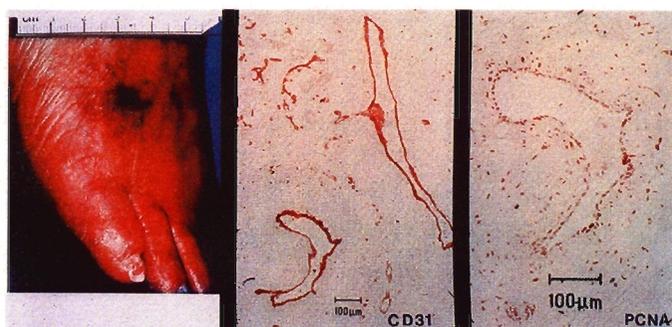


Figure 3: Spider angioma and immunostaining  
Left: one of three spider angiomas that developed about 1 week after gene therapy in distal portion of ischaemic limb. Middle and right: tissue sections stained with antibody to endothelial antigen CD31 show vascularity of lesion, while stain of adjacent 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

# RECにおける血管新生の過程

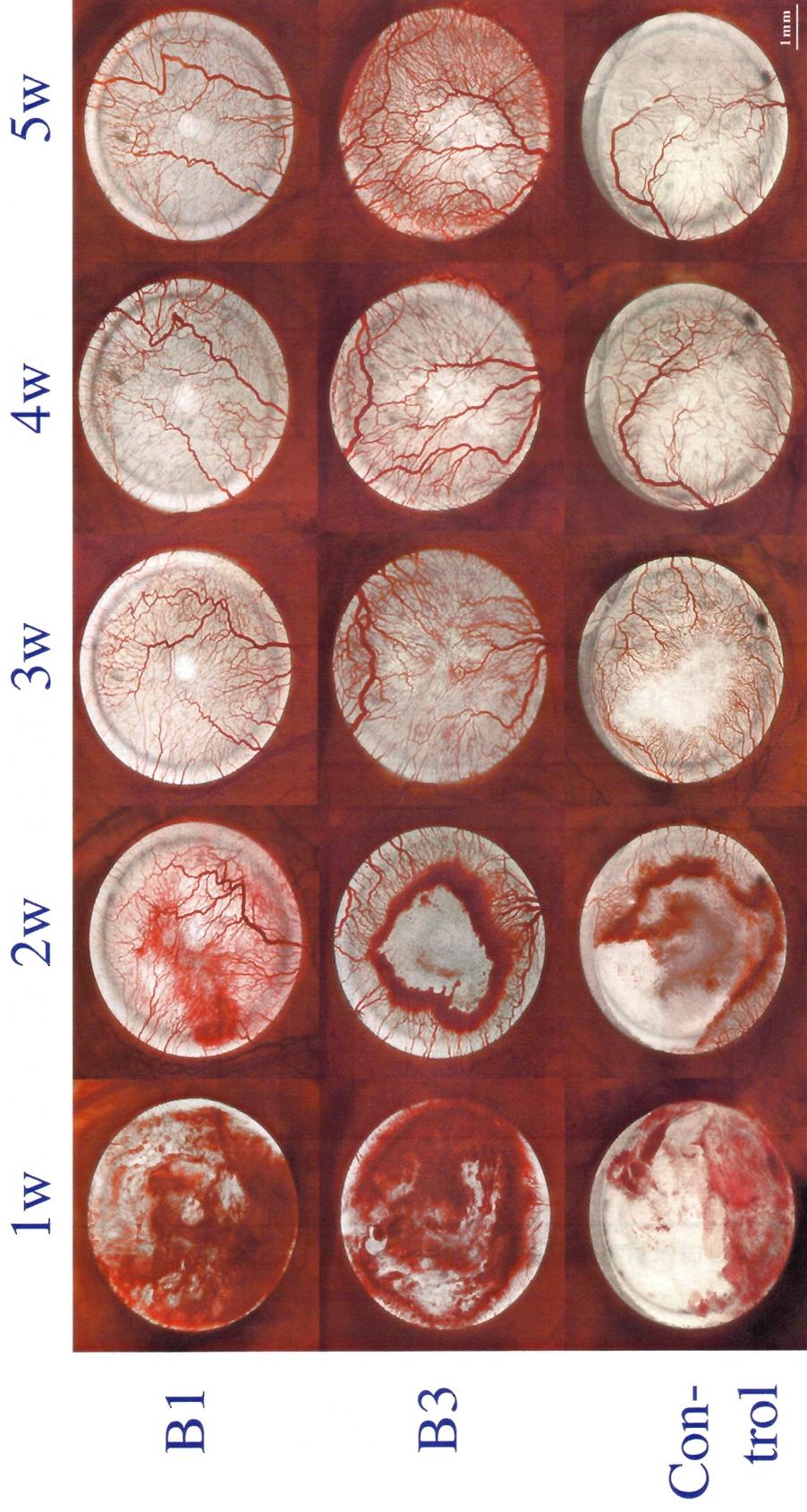


図7 リコンビナントbFGFを用いてのRECでの血管新生効果

## Comparison of Newly Vascularized Area

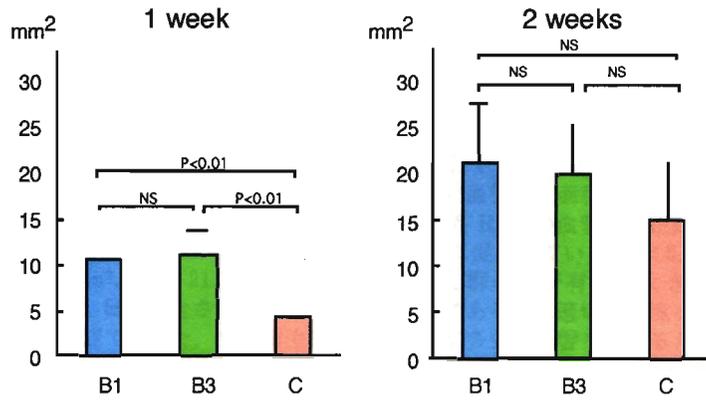


図8 リコンビナントbFGFを用いての創傷治癒における血管新生

## Vessel Density at 5th Week

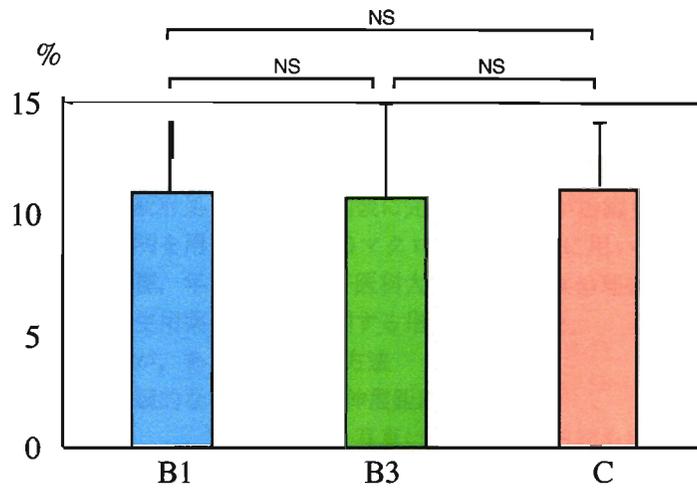


図9 リコンビナントbFGFを用いても血管密度は増加しない

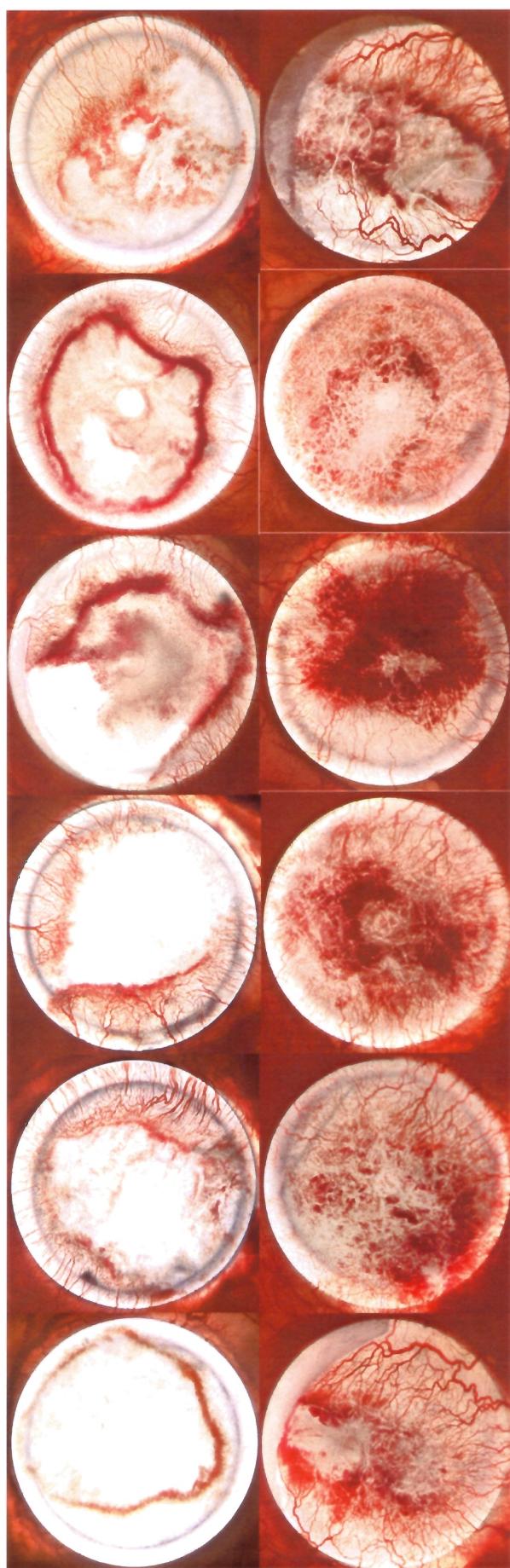
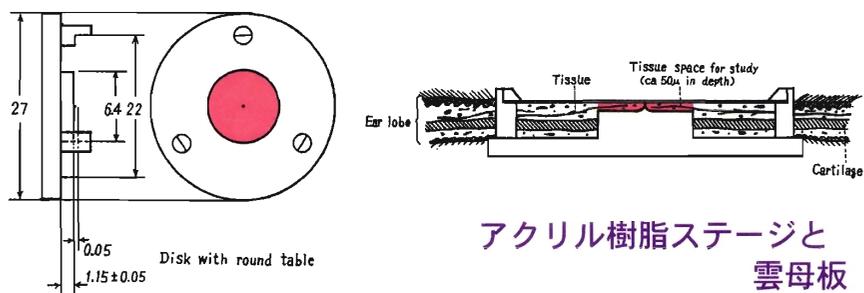


図1 RECのマクロ写真 作成後2週間

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 透析のシャントに使用される人工血管  
 大多数がePTFE製である

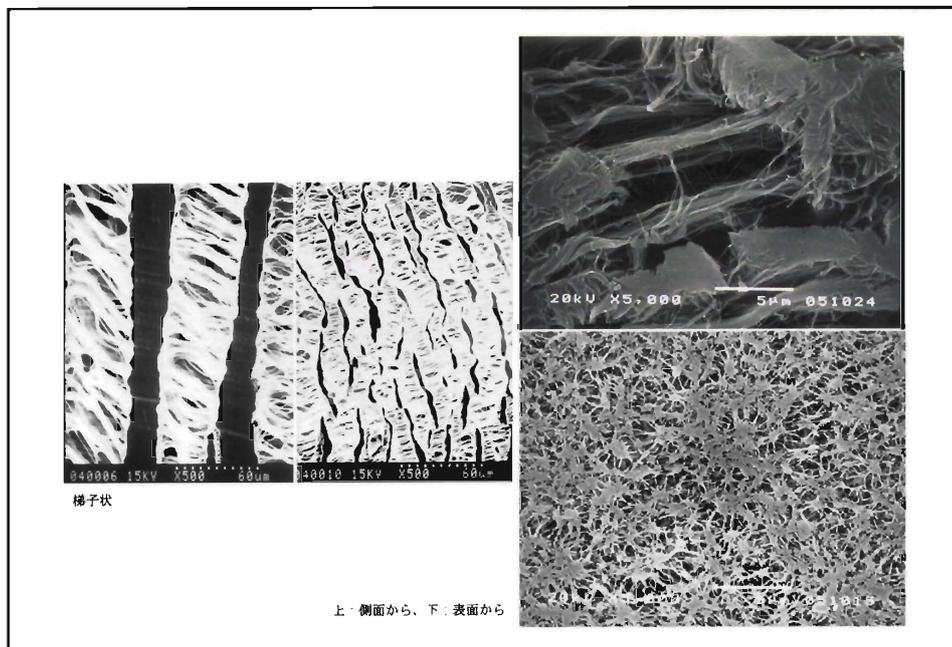
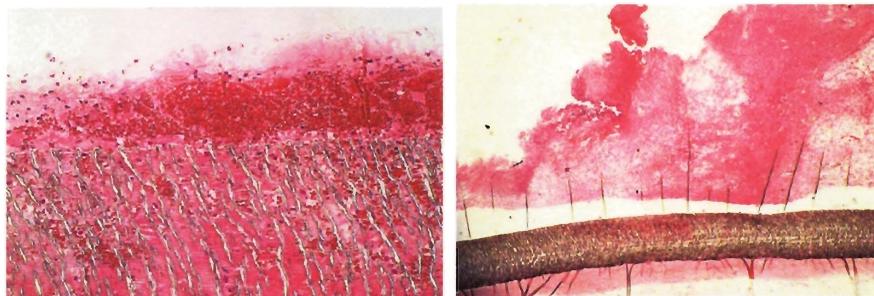


図2 ePTFE人工血管のSEMによる観察  
 梯子状の繊細な構造である。

ePTFE人工血管の血栓性（動物実験）

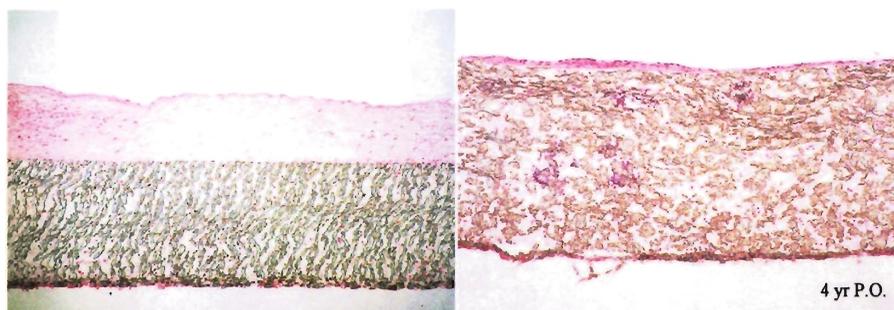


187th P.O.D.

動物実験では摘出時に赤い血栓で内面が覆われていることがある。新鮮な血栓であることは易剥離性を意味する

図3 動物実験では植え込み後遠隔期になっても血栓の付着を観察することがある。

ePTFE人工血管の治癒（臨床）



臨床から得られた標本で内面が平滑であっても免疫組織染色で内皮細胞を証明することは困難である。

図4 BTシャント位のように高流量で平滑な内面を観察することがある。

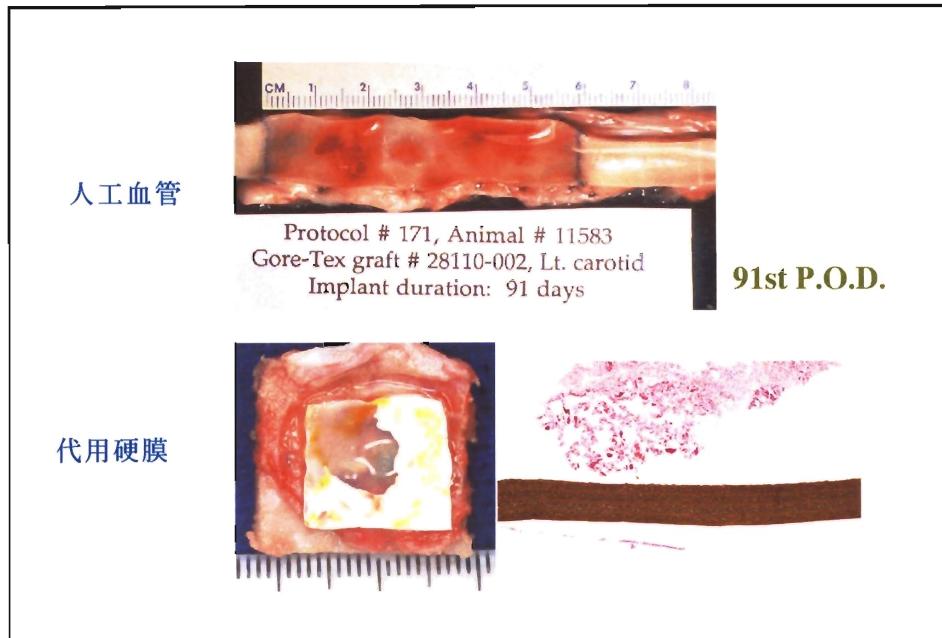


図5 ePTFE周囲に形成された組織は易剥離性である（実験）

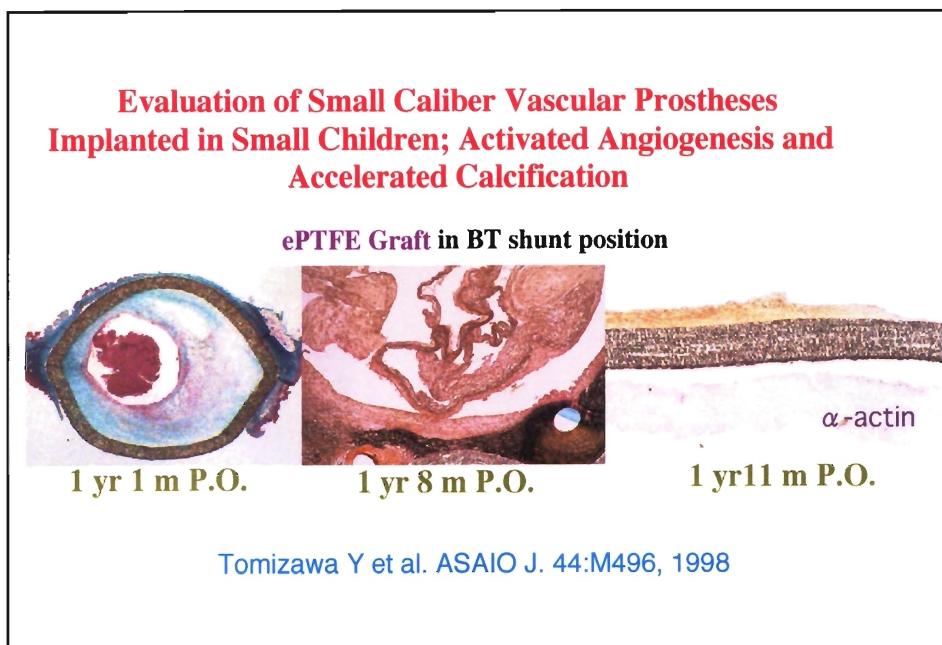


図6 臨床からのePTFE人工血管の摘出標本。内膜肥厚（左）をきたすことがあるが容易く剥離する（中&右）。

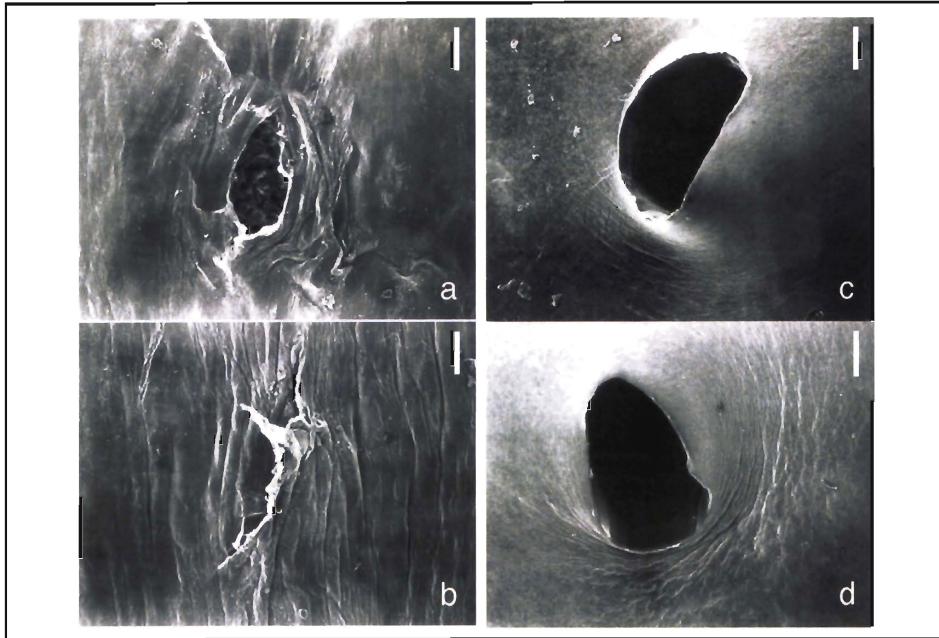


図7 生体材料（左: a & b）とePTFE製素材（右: c & d）を針で穿刺したところ。入口（上: a & c）と出口（下: b & d）

### 人工血管の注射針を用いた穿刺に関する一考案

#### ePTFE Graft

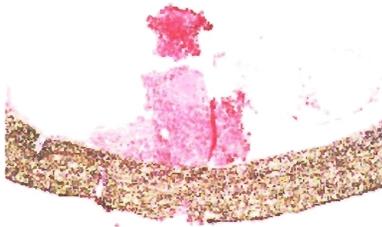


富澤康子 他. 人工臓器. 25:230, 1996

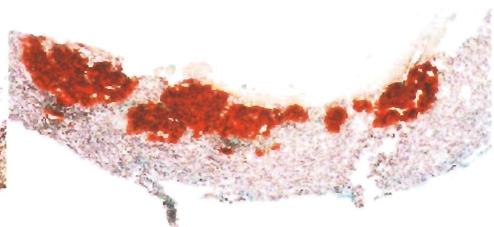
図8 ePTFE製人工血管に注射針を刺したところ（左上）と抜いた穴（左下）。動物実験にて植え込んだePTFE製人工血管に針を刺した穴（右）の摘出標本。穴は閉じずにそのまま残った。

Blalock-Taussig短絡に用いられたEPTFE人工血管に石灰化が認められた1症例

ePTFE Graft in BT shunt position at 4 yr P.O.



吻合部近くの血栓

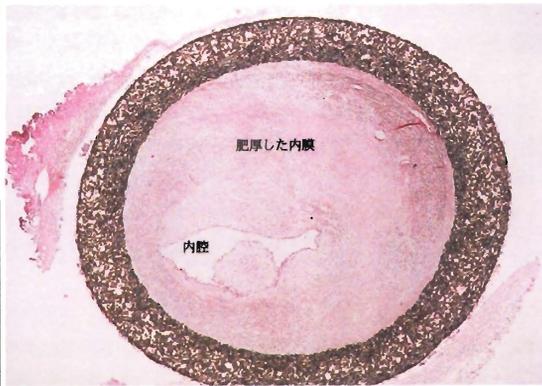


人工血管壁内の石灰化

高梨吉則、富澤康子 他. 胸部外科. 50:71, 1997

図9 術後4年で内膜が形成されず（左）血管壁に石灰化が観察された（右）。

先天性心疾患の姑息的シャント術に使用された人工血管の変化



肥厚した内膜

内腔

左下と同一症例

富澤康子 他. 人工臓器. 26:524, 1997

図10 先天性心疾患のシャントに使用されたePTFE人工血管

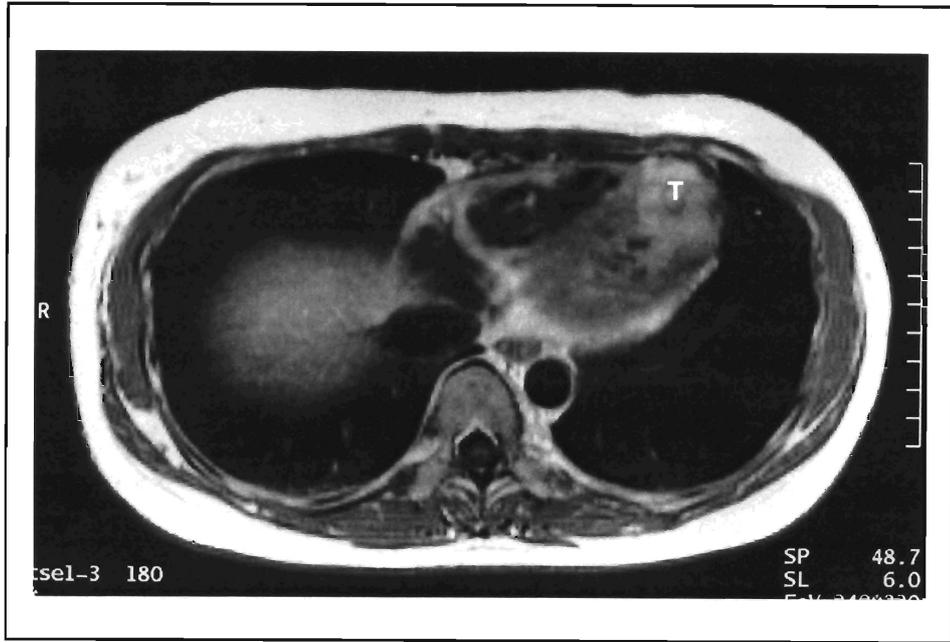


図1 CT所見  
心尖に腫瘍(T)が観察される。

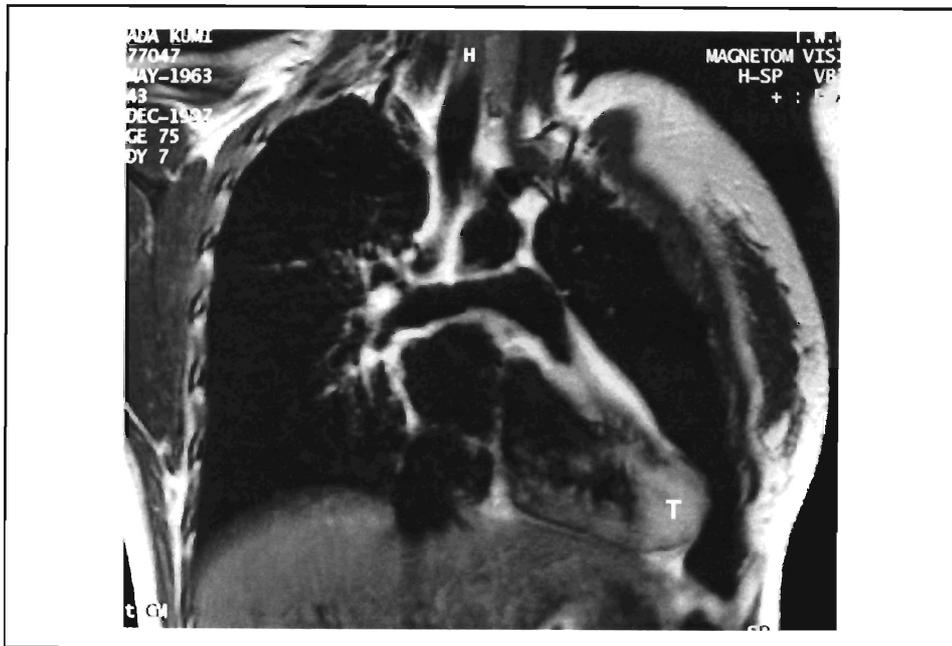


図2 MRI所見  
心尖に腫瘍(T)が観察される。

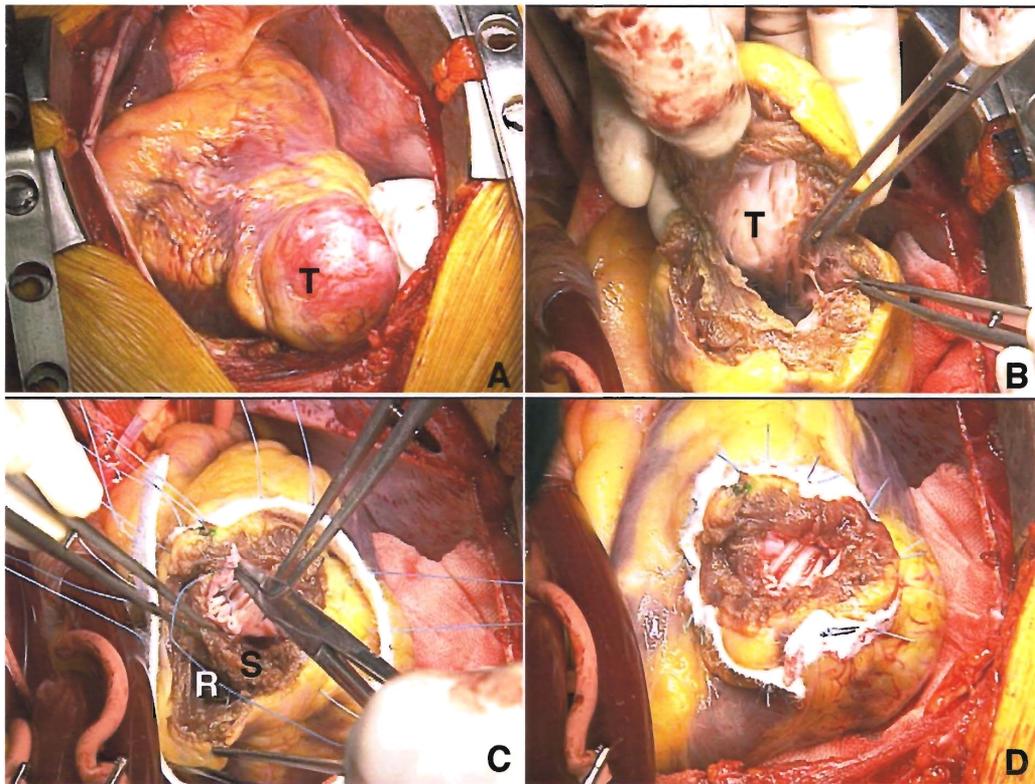


図3 術中写真 (論文中のFig. 1)

A. 心尖にあるある腫瘍(T)

B. 左室腔(L)側の腫瘍(T)は白色

C. 短冊状のフェルトを持ちいた。パッチから中隔(S)へ針をとおす。右室腔(R)が見える

D. 完成した心尖

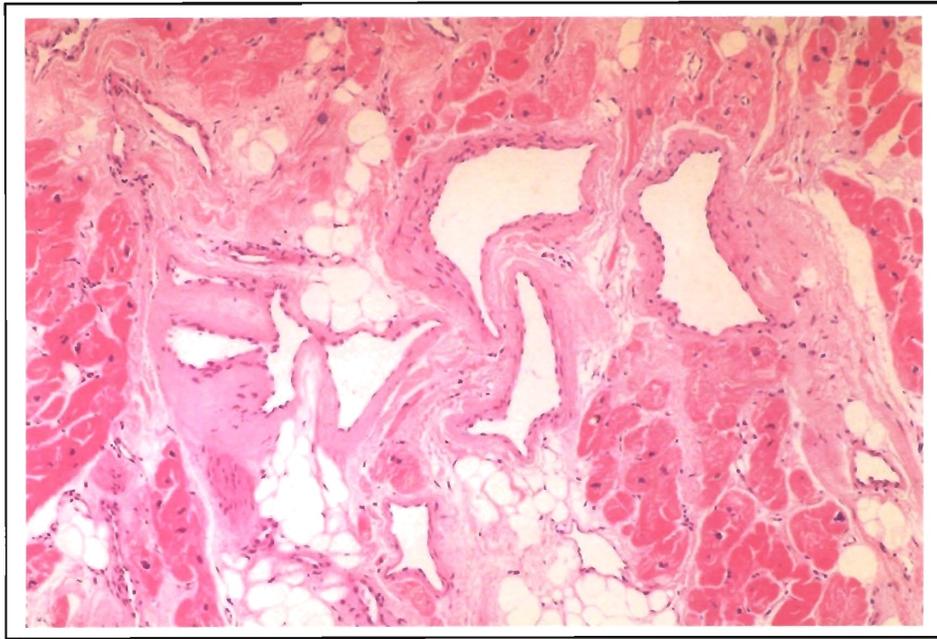


図4 血管腫の組織学的検討  
血管腔が著しい。  
(ヘマトキシリン-エオシン染色)

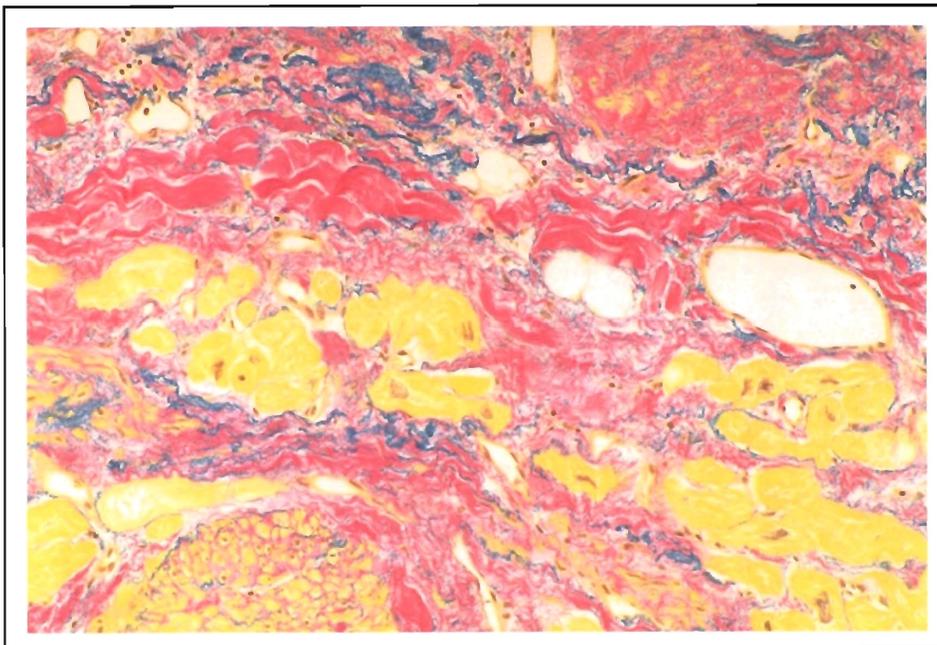


図5 摘出血管腫の組織学的検討  
筋線維、脂肪、血管、弾性線維等が観察される。  
(ビクトリア-ブルー染色)

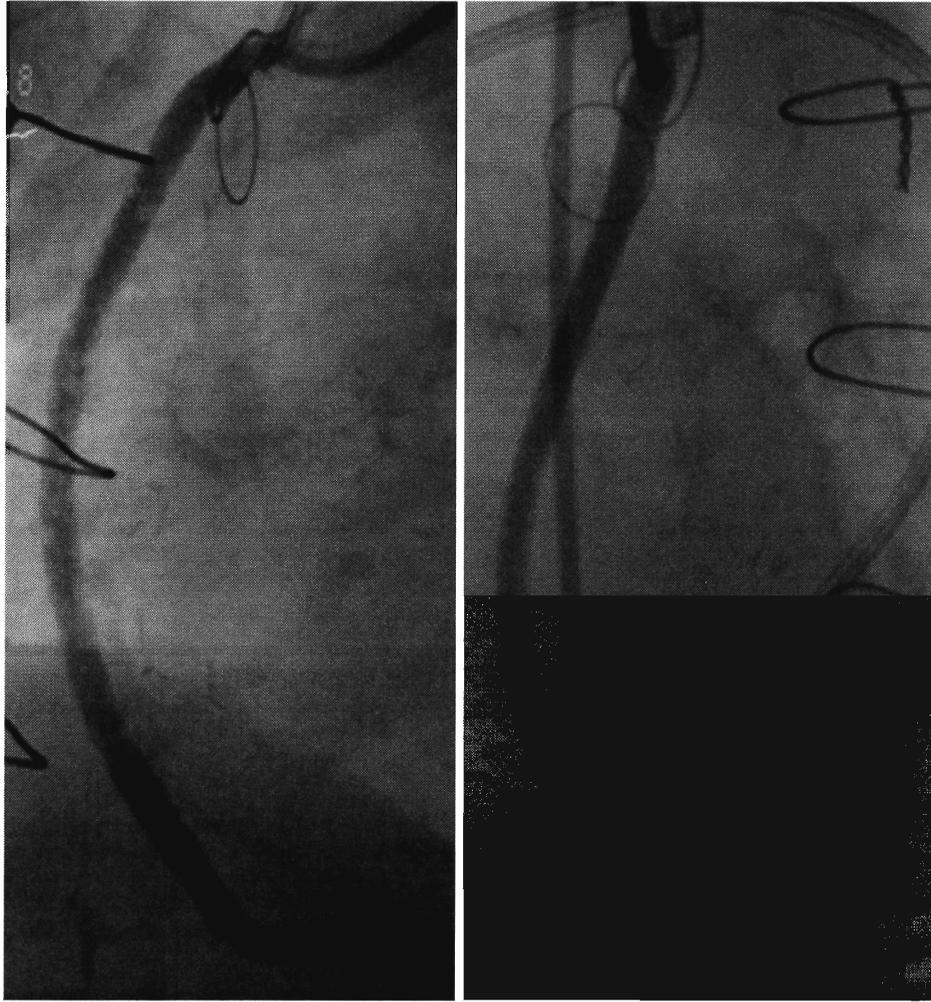


図1 症例1のSVグラフト造影  
グラフト壁(A)は非イオン性低浸透圧性造影剤により血栓形成が起こり平滑ではなくなった。しかし翌日にはグラフト壁は平滑(B)で血栓も無かった。翌日の造影にはイオン性造影剤が使用された。

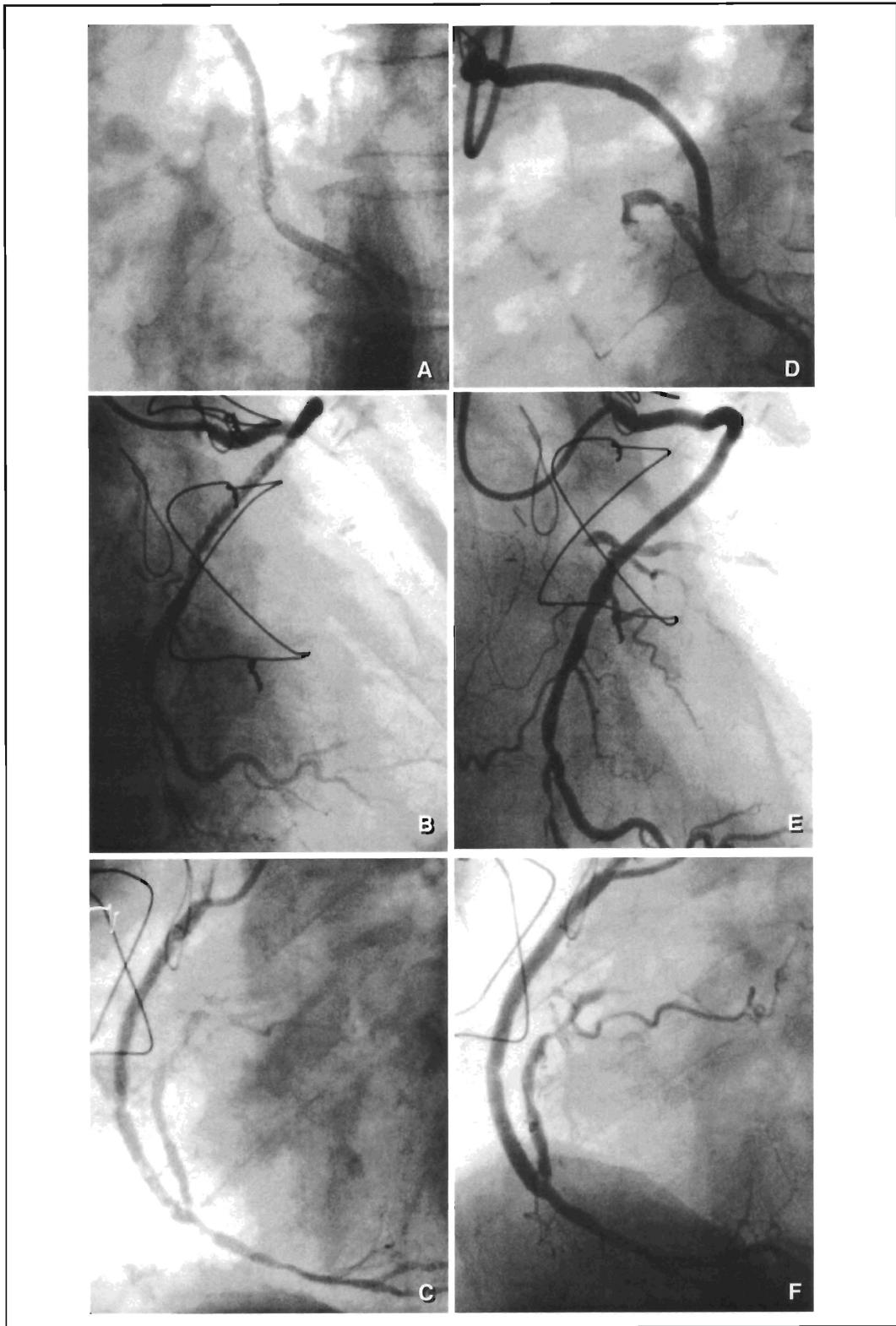


図2 症例3のSVグラフト造影

1本のグラフトはLCXへ(A & B)、もう1本はRCAへ(C)吻合されているが、非イオン性低浸透圧性造影剤で造影後に大量の血栓がグラフト内に形成された。翌日の造影(D, E & F)ではイオン性造影剤を使用した血栓は消失している。