

自家組織および自己の培養線維芽細胞移植の
虚血部における血管新生に与える影響

(課題番号 11670712)

平成11, 12年度科学研究費補助金 (基盤研究C)
研究成果報告書



平成13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学講座教授)



自家組織および自己の培養線維芽細胞移植の
虚血部における血管新生に与える影響

(課題番号 11670712)

平成11, 12年度科学研究費補助金 (基盤研究C)
研究成果報告書

平成13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	7
2. 血管新生の観察の歴史	11
3. 内因性サイトカインの活性化による虚血心筋における血管新生 および側副血行路形成の過程	23
4. Rabbit ear chamber の簡易撮影方法	27
3. 参考論文	
1. 人工血管；現況と将来	33
2. 組織工学を用いた人工血管	57
3. 心嚢液中のサイトカインからみた心臓における生体反応の検討	65
4. Use of arterial grafts for coronary revascularization; Experience of 2987 anastomoses	75
5. Laser による Transmyocardial revascularization	81
6. 成人期の先天性心疾患	91
7. 血管造影剤と血圧低下、ショック	107

臨床医として患者の病状改善をみる喜びに勝るものはない。しかしながら、なす術もないことに歯痒い思いをし、さらなる治療の進歩を切に祈るしかない場面もある。高齢者社会に向かい、ますます増加するであろう動脈硬化性疾患、虚血性心疾患に対しての治療は各種薬剤の開発は勿論であるが、冠動脈バイパス術をはじめとして、経皮的冠動脈形成術など、直接的、物理的な冠動脈血行再建法の進歩が、多くの人々のQOLを高めている。一方それらの適応が及ばない症例が存在する。

近年、新たな試みとして、血管新生因子を遺伝子として、またプロテインとして用いる血管新生療法が、またサイトカインや血管新生因子が盛んに研究されているにもかかわらず、直接に新生血管を証明した報告はいまだ見られない。我々は患者自身のbFGFを心筋に局所注入し新生血管を形成させ、心筋への血流を確保しようという発想の下に実験研究を着々と進めてようやくその入り口に辿り着き、一步踏み込んだところである。

この報告書は過去2年間の我々の研究成果である。今後、この『自家組織および自己の培養線維芽細胞移植の虚血部における血管新生に与える影響』という課題をさらに発展させ、最終目標の臨床の場で応用されるよう一層の努力を続けたい。

1. 研究課題名：研究組織・研究経費・研究発表

【研究課題名】

自家組織および自己の培養線維芽細胞移植の
虚血部における血管新生に与える影響

研究課題番号 11670712

【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 冨澤康子（東京女子医科大学循環器外科助手）

【研究経費】

平成 11 年度 2,200 千円

平成 12 年度 1,300 千円

計 3,500 千円

【研究発表】

学会誌

1. 西川和子、小笠原定雅、島本健、楠元雅子、伊藤直人、木全心一：大動脈炎を合併した強直性脊椎炎の 1 症例、心臓, 31:607-612, 1999
2. 内田ひろ、小堀悦孝、藤田洋子、西川和子、西田水奈子、小笠原定雅、島本健、楠元雅子：スポーツ心臓における左室拡張能の検討、臨床スポーツ医学, 16:822-825, 1999
3. 西川和子、小笠原定雅、西田水奈子、水野弘美、内田ひろ、島本健、楠元雅子、迫村泰成、笠貫宏、石山茂：全身性硬化症における臨床像と心筋病変、循環器科 45:293-294, 1999
4. 鈴木豊、美山晃、冨澤康子：Rabbit ear chamber の簡易撮影方法、呼と循、48:93-96, 2000
5. 冨澤康子、西田博、遠藤真弘、小柳仁：人工臓器とトラッキング；医用材料植え込み患者追跡の実際、人工臓器、29:496-499, 2000
6. 冨澤康子、小柳仁：組織工学を用いた人工血管、血管の病気と治療、現況と将来展望、Cardiovascular Med-Surg, 2:77-83, 2000
7. 遠藤真弘、栗原寿夫、木原信一郎、上部一彦、冨澤康子、青見茂之、西田博、橋本明政、小柳仁：冠外科と弁外科の合併手術の早期及び遠隔成績、胸部外科、53:672-677, 2000
8. 石田徹、西田博、冨澤康子、野地智、上部一彦、富岡秀行、森下篤、遠藤真弘、小柳仁：20 年以上の透析例を持つ慢性透析患者に対する開心術 3 例の経験、胸部外科、53:477-481, 2000
8. 石田徹、西田博、冨澤康子、野地智、上部一彦、富岡秀行、森下篤、遠藤真弘、小柳仁：再々冠状動脈バイパス術 4 例の経験、胸部外科、53:563-566, 2000
9. 栗原寿夫、冨澤康子、西田博、島袋高志、遠藤真弘、小柳仁：ステロイド療法を

- 要する患者に対する冠動脈バイパス術の検討、冠疾患誌、6:89-91, 2000
10. 遠藤真弘、冨澤康子、川合明彦、西田博、小柳仁：心不全に対してかなり有効と期待される手術的治療法、-虚血性心筋症に対する conventional な手術-、クリニカ、27:51-56, 2000
 11. 遠藤真弘、西田博、冨澤康子、小柳仁：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)、心臓、32:663-665, 2000
 12. Ando M, Tomizawa Y, Noishiki Y, Terada M, Imai Y: Autologous tissue-fragmented extracardiac conduit with rapid, stable endothelialization due to angiogenesis, Jpn J Thorac Cardiovasc Surg, 48:153-160, 2000
 13. 冨澤康子：人工血管、-現況と将来-、人工臓器、第16回日本人工臓器学会卒後教育セミナー、編集川田志明、日本人工臓器学会、平成12年7月発行
 14. 冨澤康子、遠藤真弘、小柳仁：血管造影剤と血圧低下、ショック、この薬のこの副作用、第二版、医歯薬出版株式会社、松田重三編集、2000年、東京、128-131
 15. 冨澤康子、遠藤真弘、西田博、今井康晴、石塚勉、林哲男、小柳仁：心嚢液中のサイトカインからみた心臓における生体反応の検討、Coronary, 16:288-292, 1999
 16. 遠藤真弘、西田博、冨澤康子、小柳仁、鶴見由起夫、笠貫宏：カテーテル治療の合併症・不成功例に対する外科治療、Coronary, 16:241-249, 1999
 17. 西田博、冨澤康子、遠藤真弘、小柳仁：緊急冠動脈バイパス術における動脈グラフトのみによる多枝バイパス手術、胸部外科、52:688-692, 1999
 18. 西田博、冨澤康子、遠藤真弘、小柳仁：初回待機的冠動脈バイパス手術の障害枝数別早期および遠隔成績、Coronary, 16:221-228, 1999
 19. 西田博、上杉英之、冨岡秀行、冨澤康子、遠藤真弘、小柳仁：IABP を必要とする acute coronary syndrome; 緊急 CABG の早期および遠隔期からみたステント時代における治療戦略、ICU と CCU、23:927-931, 1999
 20. 冨澤康子、鈴木進、遠山憲康、岡本美樹、平山芽衣、菊池千鶴男、田中佐登司、西田博、遠藤真弘、小柳仁：医療用具の使用状況：IABP バルーンの使用におけるヒューマンエラーと不具合、人工臓器、28:566-569, 1999
 21. 野一色泰晴、山根義久、大越隆文、冨澤康子、殿倉英次：超極細繊維交絡型人工血管の滑脱テストおよび物性テスト、人工臓器、28:547-550, 1999
 22. 野一色泰晴、山根義久、大越隆文、冨澤康子、殿倉英次：超極細繊維交絡型人工血管の開発、人工臓器、28:278-283, 1999
 23. 西中知博、西田博、遠藤真弘、冨澤康子、椎川彰、佐藤志樹、佐藤渉、小柳仁：冠動脈バイパス手術後に上部消化管出血を合併した症例の検討、冠疾患誌、5:46-49, 1999
 24. 古川博史、遠藤真弘、西田博、冨澤康子、八田光弘、小柳仁：虚血性僧帽弁閉鎖不全症の外科的治療の検討、当院における 20 年間、45 例および低心機能例を中心とした検討、冠疾患誌、5:50-54, 1999

25. 富岡秀行、西田博、迫村泰成り、富澤康子、北村昌也、遠藤真弘、小柳仁：動脈グラフトの病理組織像とグラフト材としての限界、グラフト材としてどこまで利用できるのか、冠疾患誌、5:110-115, 1999
26. 西田博、田中佐登司、富岡秀行、広田潤、田鎖治、野々山真樹、新浪博、平田欽也、富澤康子、川合明彦、青見茂之、八田光弘、遠藤真弘、小柳仁：慢性透析患者に対する CABG 周術期の循環管理、77 例の経験から、循環制御、20:30-33,1999
27. 西田博、富澤康子、遠藤真弘、小柳仁：Laser による Transmyocardial revascularization、呼と循、47:455-463、1999
28. 西田博、菊池千鶴男、小澤英樹、田中佐登司、新浪博、廣田潤、平田欽也、富澤康子、川合明彦、遠藤真弘、小柳仁：多枝病変への動脈グラフトのみによる多枝 CABG の早期および遠隔成績；多枝 PTCA や MIDCAB + PTCA 併用療法の Golden Standard として、脈管学、39:367-371, 1999
29. 西田博、赤澤年正、島村吉衛、西中知博、上部一彦、富澤康子、遠藤真弘、小柳仁、押山広明、城戸隆行、野尻千里：人工心肺回路における開放式回路と閉鎖式回路の生体適合性の比較、医工学治療、11:274-278, 1999
30. 西田博、赤澤年正、近沢元太、西中知博、上部一彦、富澤康子、遠藤真弘、小柳仁、桑名克之、菊池腎、大平善之、青木正人：シリコンコーティング中空糸の高度生体適合性非コーティング中空糸との比較、医工学治療、11:428-429, 1999
31. 日比野成俊、遠藤真弘、西田博、富澤康子、平田欽也、新浪博、田中佐登司、小澤英樹、菊池千鶴男、福本淳、小柳仁：TMLR 後に左室冠状動脈瘻を認めた 1 例、胸部外科、52:488-491,1999
32. 上杉英之、青見茂之、国井佳之、斎藤典彦、富澤康子、橋本明政、小柳仁、石塚尚子：多発性硬化症を合併した僧帽弁狭窄症に対し人工弁置換術を施行した 1 例、胸部外科、52:569-571、1999
33. 石田徹、西田博、富澤康子、上部一彦、前田朋大、丁毅文、滝口信、鮎澤慶一、遠藤真弘、小柳仁：家族性高コレステロール血症を基礎疾患に持つ兄弟再 CABG 例 2 組の検討、Coronary、16:163-166、1999
34. 村田明、遠藤真弘、西田博、富澤康子、廣田潤、上杉英之、富岡秀行、依田真隆、斎藤聡、篠田尚克、鶴見由起夫、小柳仁：脊柱管狭窄症を合併した虚血性心疾患患者に対する冠動脈バイパス手術、冠疾患学会雑誌、5:149-151, 1999
35. 島袋高志、西田博、富澤康子、依田真隆、村田明、廣田潤、遠藤真弘、小柳仁：急性心筋梗塞に対する冠動脈形成術-22 時間後に心タンポナーデ症状を呈した冠動脈穿孔の一救命例-冠疾患学会雑誌、5:145-148,1999
36. 遠藤真弘、西田博、富澤康子、木原信一郎、小柳仁：心自由壁破裂に対する治療、救急医学、23:1980-1984、1999
37. Tomizawa Y, Endo M, Nishida H, Niinami H, Tanaka S, Tomioka H, Ozawa H, Kikuchi C, Koyanagi H: Use of arterial grafts for coronary revascularization; Experience of 2987 anastomoses, Jpn J Thorac Cardiovasc Surg, 47:325-329,

1999

38. Nishida H, Aomi S, Tomizawa Y, Endo M, Koyanagi H, Nojiri C, Oshiyama H, Kido T, Yokoyama K: Comparative study of biocompatibility between the open circuit and closed circuit in cardiopulmonary bypass, *Artificial Organs*, 23(6):547-551, 1999
39. Endo M, Nishida H, Tomizawa Y, Kihara S, Ishida T, Koyanagi H: Two new drainage tubes for minimally invasive cardiac Surgery, *Heart Surgery Forum*, 2:341-344, 1999

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、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

日本においても虚血性心疾患患者は急速に増加しており、それに伴ってPTCA および冠動脈バイパス術(CABG)などの治療を受ける患者は増加している。しかし患者の中には吻合しようとした冠動脈が細すぎる、多枝病変でグラフト数が足りない、すでに心筋梗塞になっていてバイパスする意味がないという問題を持つことも多い。そこで高出力レーザーを用いて直視下に心筋を貫通する穴をあける Transmyocardial laser revascularization (TMLR)という方法が諸外国でもはやされ、日本においても臨床治験が行われたが、未だに直接的な血管新生による側副血行路の形成は証明されていない。下肢の阻血にハイドロジェルバルーンを用いて血管新生を目的に遺伝子導入を行ったところ、患者に側副血行路が良好に形成された。そして、副作用ではあるがかけらが飛んで患者の足背に spider angioma が形成され、調節さえ可能であれば強力な方法である

ことが示された(Isner, 1996)。また、分離に多額の研究費が費やされているが、血管新生因子である線維芽細胞増殖因子(FGF)や血管内皮増殖因子(VEGF)を注射しても有意差が出るような新生血管は観察されていない。しかし、*in vivo*の人工血管壁内で内因性サイトカインを活性化した時には、内皮細胞の増殖および遊走、血管新生が起こった。このような状況の下、虚血性心疾患および阻血性疾患に対して、内科的および外科的治療の利点を併せ持った新しい血管新生療法の開発にかかる期待は大きい。

研究の目的

本研究では虚血性心疾患あるいは下肢の阻血あるが、直接的外科的血行再建術の不可能な症例の虚血あるいは阻血部位に、自家組織を移植する、あるいは培養した線維芽細胞を導入することにより、内因性サイトカインの産生を促進し、側副血行として働く血管新生を早期に誘導することが可能であるかの検討を行うことを目的とした。具体的には周辺を自己組織に囲まれた Rabbit ear chamber (REC)法の chamber 内において、播種した自家組織から産出されるサイトカインが周囲からの血管侵入を促進するか、播種した培養線維芽細胞が内皮細胞に形質転換するか、細胞をトレースすることにより明らかにする。さらに、形成された微小循環動態を生理学的に評価する。すなわち血管新生促進、およびその維持の至適条件を解明する。基本的な研究方針としては組織および細胞の性質と特徴を生かし、実際に *in vivo* で

働くように生体に無理無くデザインする。この研究は将来の組織工学的治療を目指しており、未来の治療に大いに貢献するものと考えた。科学研究費の交付を希望する期間内には REC モデルにおける血管新生の至適条件を解明し、関与する内因性サイトカインの分析を行うところまで成し遂げたいと考えた。

学術的な特色・独創的な点

- ① REC 法で血管新生の観察は昔からされているが、内因性サイトカインを活性化し、血管新生への影響を観察した研究は他にはない。
- ② 播種した線維芽細胞の transformation を細胞に蛍光でマークし直接追跡する。今までは間接証明しかされていない。
- ③ chamber 内に留置した自家組織へ新生血管が向かうことにより、また管腔形成が外に向かうことにより血管新生因子の影響が解明される。なお tissue-fragments 法では外に向かう管腔形成が観察されている。
- ④ 血管形成後、生理的条件を変え(O₂, CO₂ 濃度など) 微小循環動態が正常に反応するか評価する。
- ⑤ 透明窓への培養細胞の定着を良くするために、REC に用いる雲母板およびアクリル板上で培養したものをを用い効率を上げる。細胞浮遊液では細胞接着が悪い。

この研究は独創的な点を多数含んでおり、順調に解明が行われれば、新しい治療法へと発展させられ大変役に立つと考えられた。

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

臨床においてこの研究結果への要求度は高く、機序の解明は重要かつ緊急を

有することは明白な事実である。機序の解明に、オーソドックスな透明窓を用いた観察ばかりでなく、現代科学の強力な武器である組織工学的検討を加え、さらに新生血管の微小循環の動態の検討を加えることにより興味深いものとなったと考えられた。機序の解明に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により、研究は完成すると考えた。*In vivo*での血管新生研究してきた我々の経験から、この課題を克服することは、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

Arnold(1871)は、早期にしかも確実に血管新生が得られ、細胞学的レベルでの観察が可能な透明窓の研究を始め、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 Sandison(1924)が初めて透明窓で観察して以来、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、器官の移植後の生体適合性の観察など広範囲の研究がなされてきた。日本では 1958 年から透明窓を用いた血管の発生、微細循環の観察が行われている。透明窓では生体組織を連続的に顕微鏡下で観察が可能で、蛍光色素でラベルした細胞を追跡することも可能であり、病理組織学的観察が容易である。Kon(1994)らは培養細胞を透明窓に播種し、transformation を間接的に電子顕微鏡的に証明したが、直接的ではないため反論も多い。また血管新生に影響する因子に関しても全く解明されていない。関与するサイトカインおよびその時期に関しては、基礎データが必要である。本研究は臨床応用を目標にしており、動物実験での直接証明を志しているため興

味ある知見が得られるものと考えた。

本研究の着想に至った経緯・準備状況

我々は今まで、血管新生に興味を持ち基礎的検討を行ってきており、その経過の中で自己組織およびその中に含まれる線維芽細胞の産生する内因性サイトカインが重要な意味を持つことに注目していた。生体で直視下に観察でき、日本で40年も前から使用されているRECモデルに着目した。RECモデルを作成するとまず、出血に伴って新生血管が周囲から侵入してくるが、この過程を連日、生体顕微鏡下で観察していて、REC内の細胞および細胞の遊走を促進する因子に興味を持った。原始的な血管叢からの血管新生には出芽(proutingあるいはbudding)と嵌入(intussusceptionあるいはnon-sprouting)が報告されているが、組織からのbFGFを含む内因性サイトカイン、さらに培養線維芽細胞からのサイトカインの影響を直視下で連続して形態学的に観察する事を計画した。preliminary dataとして家兎の動静脈を培養し、その細胞培養した細胞がアクリル板および雲母板に接着し、家兎のRECとして装着した後も細胞が良好に接着しているのを1週間にわたって観察した。血管新生が完成した後の、免疫組織学的評価法も確立されている。基礎実験は順調に進んでおり、十分に準備して始められると考えた。

研究計画

平成11年度には①-⑥を、平成12年度には④-⑫を研究予定であった。

基礎実験

- ①細胞培養のための材料採取:家兎を全身麻酔下での皮下結合組織、大腿動脈、大腿静脈、大網などの組織を採取する。
- ②細胞培養:採取した材料をシャーレの上で十分量になるまで培養し、フラス

コに移す。細胞の増殖速度を観察する。また、雲母板、アクリル板を細胞浮遊液内に沈め、表面に細胞が接着するまでの期間を測定する。もし、雲母板、アクリル板への細胞接着が悪い場合には表面をファイブロネクチンなどで接着性を良くする方法を考える。

- ③ RECモデル作成:家兎の両耳に雲母とアクリル板でのchamberを装着し、まずは対照として無処理のものを作成する。これによって麻酔法、消毒法、安全性を確立する。
- ⑥ RECモデルにおける血管新生の観察:以下の3通り+対照で家兎の両耳にRECを装着し、最初の2週間は連日、それ以降は週2回のCCDビデオカメラによる観察を行う。血管の新生具合、動脈静脈瘻になっているか、出芽の状態など。どの群が早いか。なお、細胞培養の細胞は自己あるいは同じ一族を用いる。

- 1.対照:無処理のREC
- 2.雲母板上で細胞培養したもの
- 3.アクリル板上で細胞培養したもの
- 4.細胞浮遊液をchamber内に注入し、周囲をフィブリン糊、あるいはコーゲンゲルでシールする。

- ⑦自己の皮下結合組織を細切しRECのchamberの中に封入:tissue-fragmentsに向かって周囲からあるいはfragmentsよりtubular formationすることが予想されるが、2週間の経過を観察し、細胞分裂が著明な時点で試料を採取し、basic fibroblast growth factorなどを免疫組織学的に検出する。
- ⑧新生血管の樹脂模型作成:新生血管の形成過程には6種類の血管が存在するといわれており、その種類を検討するために、血管叢が完成する前に動物を脱血屠殺し、メルコックス樹脂を動脈

から注入し、血管の鋳型を作成し、周囲は化学的に処理し、走査電子顕微鏡的に内皮細胞の連続を観察する。

- ⑨播種した細胞の追跡:播種する細胞に FITC, Dil, Acridine Orange などの蛍光色素か、粒子のそろった墨汁、インクを用いてマークを付け⑥の実験を行う。細胞の transformation が起こるか連続観察する。
- ⑩新生血管の組織学的検討:新生するのが出芽か嵌入によるかを検討するために、試料を採取し連続切片を作成する。

応用研究

- ⑪微小循環の観察:基礎実験では血管新生が起こると同時に退縮、血栓閉塞、吸収、攣縮が観察された。
- ⑫骨髄組織の血管新生への応用:家兎の自己の骨髄組織を REC の chamber に封入する。未熟なあるいは未分化の細胞は分化する。
- ⑬雑種成犬への骨髄播種:雑種成犬を全身麻酔下に開胸し、前下行枝の末梢を結紮し心筋梗塞領域に上前腸骨領から採取した骨髄を注入し、1週間後に試料を採取し、血管新生を観察する。
- ⑭家兎の REC 浸出液の ELISA 分析: bFGF および VEGF を分析する。

研究成果と参考論文

この報告書の研究成果論文としてまとめた第一は『血管新生の観察の歴史』を最初に sprout を観察し、その観察所見を記載したところからの歴史を紹介した。第二に『内因性サイトカインの活性化による虚血心筋における血管新生および側副血行路形成の過程』として REC の観察所見から、心筋内の予想される血管新生過程に関する考案を述べた。第三に『Rabbit ear chamber の簡易撮影方法』を示したが、これはこ

の研究を行う過程で撮影法を開発し、有用であったため記載した。

参考論文として、人工血管の基礎と臨床を『人工血管; 現況と将来』としてまとめ、これには貴重な資料をカラーにて添付した。将来の人工血管を『組織工学を用いた人工血管』としてまとめた。不安定狭心症症例の心囊液中の bFGF が増加しているという論文が雑誌 Circulation で話題になったが、当施設にて追試し、『心囊液中のサイトカインからみた心臓における生体反応の検討』としてまとめた。冠動脈バイパス術での動脈グラフトの使用が増加しているが、当院での傾向を『Use of arterial grafts for coronary revascularization; Experience of 2987 anastomoses』としてまとめた。本研究では血管新生をテーマに選んだが、日本においても Laser による血管新生の試みは話題になっており、『Laser による Transmyocardial revascularization』として考える機会を持った。臨床の循環器内科医として『成人期の先天性心疾患』をまとめ参考論文とした。また、冠動脈造影で使用する造影剤の副作用について『血管造影剤と血圧低下、ショック』とまとめ、参考とした。

まとめ

我々は自家組織および自己の培養線維芽細胞移植からの『内因性サイトカイン』を利用することにより虚血性心疾患に血管新生を利用できると考え研究を行った。内因性サイトカインを応用するにはまだ未知の領域が多く、さらに研究を進めていきたい。

血管新生の観察の歴史

東京女子医科大学循環器内科 楠元雅子

血管の発生、分化については Arnold (図 1), Clark, 他が鶏胎児、卵黄嚢、オタマジャクシにおける観察を行った。血管新生作用 "angiogenesis" は J. Folkman により腫瘍への血管を perfuse する因子が働いて起こる現象として 1971 年、すなわち Arnold の報告後 100 年経過してから報告された(図 2)。透明室装置は Clark (1909) がオタマジャクシ尾鰭にガラス板をはめ込んだのが最初であり(図 3)、この報告では血管の新生経過と赤血球が回収される過程が記載されている(図 3, 4)。哺乳類においては 1924 年に Sadison が家兎の耳介にセルロイド板の透明室を装着し、血管の生態を観察したのが最初である。これは長期観察可能であった。我が国においても浅野らが血管の発生、微細循環動態の観察を行っている(図 5)。我々はフィルターを応用して、透明窓へ周囲から侵入する血管の観察を可能にした(図 6)。

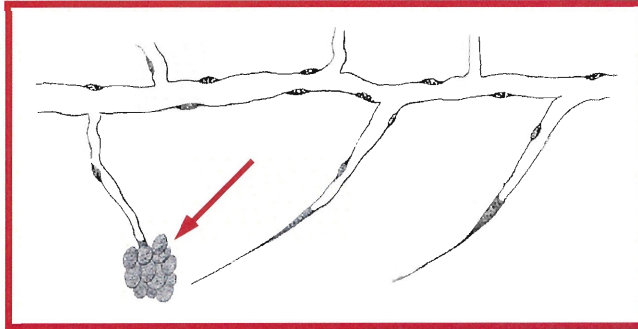
透明室における血管叢の形成過程は①線維素網組織の形成、②毛細血管叢の新生、③成熟血管叢の完成の 3 期に大別される。Rabbit ear chamber (REC) は装着後、透明な

組織浸出液で満たされ、円形細胞が拍動しているのが観察できる。また、線維素網に接着する線維芽細胞、マクロファージも装着後 1 週間以内に観察される(図 7)。以前、佐藤らが極細繊維に沿って線維芽細胞を観察したのにならぬ(図 8)。

芽出毛細血管先端部では、盲管状の毛細血管(capillary sprout)を形成し、赤血球がほとんど動かないか、緩くピストン運動を反復するのが観察されている。我々の REC モデルにおいても血管に連続する囊状の構造物の中に赤血球が緩やかに流れているのが観察された(図 9)。また、毛細血管の新生には出血層を伴うが、Sadison が 1928 年に芽出毛細血管先端部の少量の出血層について指摘している。

新生毛細血管叢(original plexus)は成熟血管叢へと発達し、その後は capillary remodeling するが、血管の成長、萎縮については、血流が安定するまで活発な血管の消長を観察し、動静脈に分化しての主要血流路の確立を見て初めて透明室内血管の安定性を確認する(図 10)。

Experimentelle Untersuchungen über die Entwicklung der Blutcapillaren

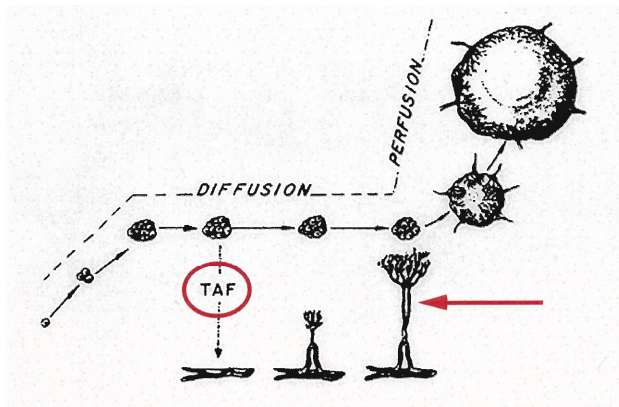


血管の発生、
分化

Arnold J et al. Virchows Arch. 53:70, 1871

図1

Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications



Tumor-angiogenesis
factor (TAF) may be
the mediator of
neovascularization.

Forkman J. N Engl J Med. 18:1182, 1971

図2

Observations on Living Growing Lymphatics in the Tail of the Frog Larva

Jun 12



Jun 15



Jun 21

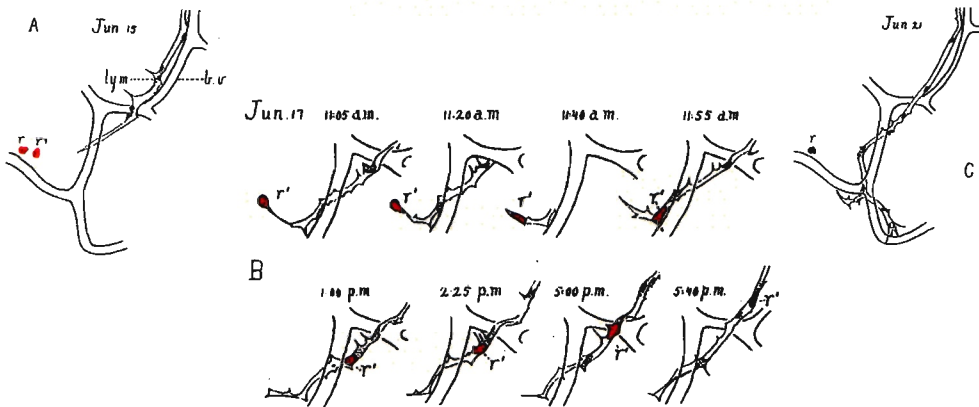


FIG. 1.—Three successive stages of growing lymphatics and blood-vessels in dorsal fin of *Rana catesbeiana* larva. $\times 30$.
Lymphatics in solid black, blood-vessels in lines. Vessels near tip are omitted. A, A', A'', etc., indicate same vessels in different stages. M, muscle edge; N, notochord.

Clark ER et al. Anat. Rec. 3:183, 1909

☒3

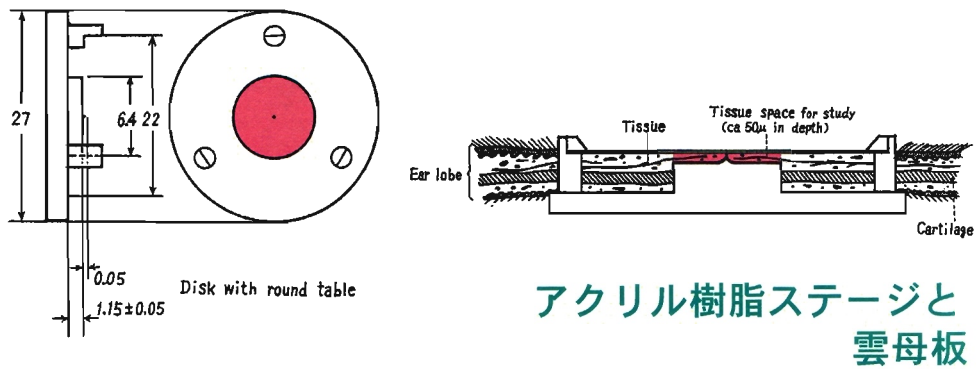
Observations on Living Growing Lymphatics in the Tail of the Frog Larva



Clark ER et al. Anat. Rec. 3:183, 1909

☒4

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5

CCH- 48lt, 2 weeks P.O.



図6

Fibroblasts on fibrin meshwork

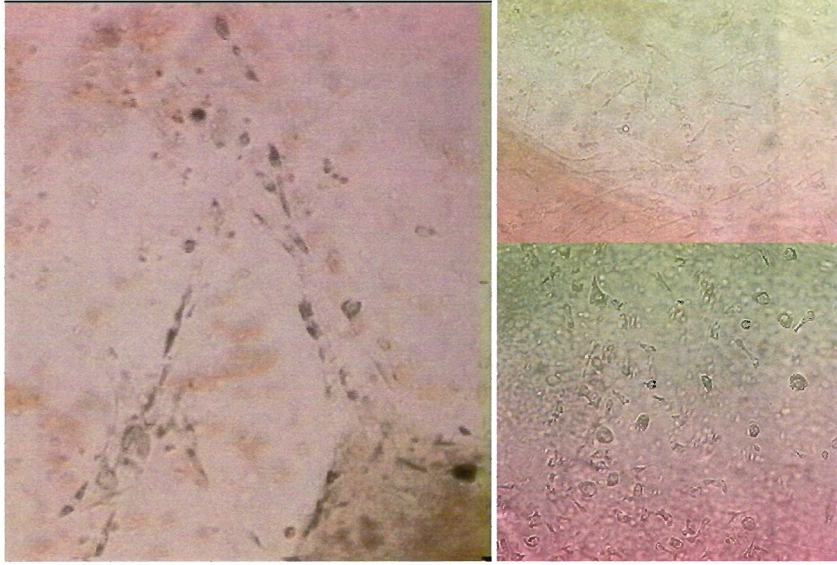


図7



S. Satoh

図8

Sprouts

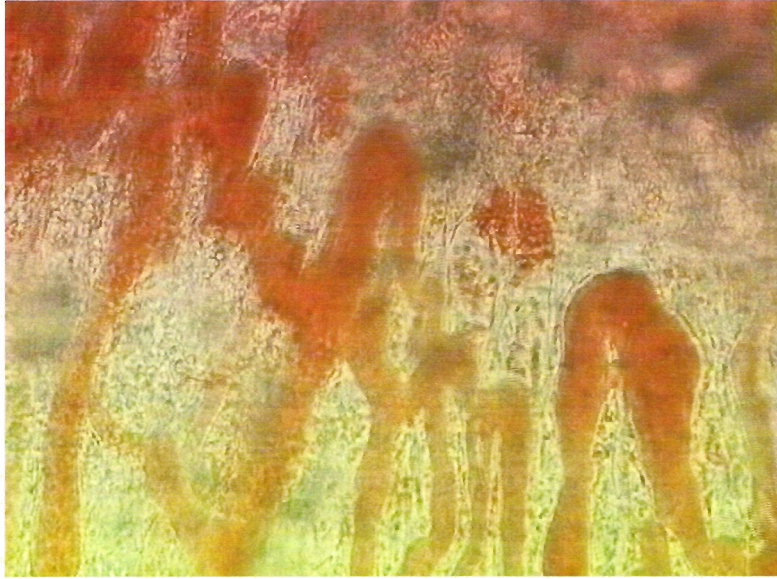


图9

A-V Shunt



图10