

非開胸下イヌ急性心筋梗塞モデルを用いた bFGF と VEGF 併用心膜腔内投与による血管新生療法に 関する基礎的検討

東京慈恵会医科大学内科学講座循環器内科

小 川 崇 之

(受付 平成 13 年 8 月 1 日)

ANGIOGENIC THERAPY OF ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION BY SIMULTANEOUS INTRAPERICARDIAL ADMINISTRATION OF BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR AND VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR

Takayuki OGAWA

*Division of Cardiology, Department of Internal Medicine,
The Jikei University School of Medicine*

Angiogenic therapy with growth factors might be used in ischemic heart disease. I examined whether simultaneous transcatheter intrapericardial administration of two promising factors angiogenesis—basic fibroblast growth factor (bFGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF)—induces angiogenesis of capillaries, arterioles, and venules in a new canine model of acute myocardial infarction. Acute myocardial infarction was produced in 13 dogs by selective embolization with absorbent polymer into the left anterior descending artery. Plain saline (7 dogs) or bFGF (100 μ g) and VEGF (10 μ g) dissolved in saline (6 dogs) were injected through the right atrium into the pericardial cavity by a needle-tipped catheter. Two weeks later angiography was performed and the infarcted hearts were examined histologically. Two weeks after infarction, the left ventricular ejection fraction had increased significantly more in dogs treated with bFGF and VEGF (from $31.3 \pm 2.3\%$ to $42.7 \pm 2.2\%$) than in dogs treated with saline (from $32.0 \pm 1.2\%$ to $33.7 \pm 2.2\%$). The number of capillaries per unit area ($200 \times 300 \text{ m}^2$) in the border zone of the infarcted area and the maximum density of SMemb-positive cells were significantly greater in dogs treated with bFGF and VEGF (55.8 ± 7.9 and 36.0 ± 4.4) than in dogs treated with saline (30.9 ± 2.6 and 11.2 ± 0.5). The numbers of arterioles and venules with existing SMemb-positive cells were greater in dogs treated with bFGF and VEGF (0.9 ± 0.2 and 1.6 ± 0.2) than in saline-treated dogs (0.2 ± 0.1 and 0.3 ± 0.1). These results indicate that combined use of bFGF and VEGF induces angiogenesis of capillaries, arterioles, and venules and that transcatheter intrapericardial administration can be used for angiogenic therapy in ischemic heart disease.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2002; 117: 171-82)

Key words: angiogenesis, basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor, SMemb

I. 緒 言

虚血性心疾患の治療法として、薬物療法、経皮的冠動脈形成術、冠動脈バイパスグラフト術が行われている¹⁾²⁾。しかしながら、临床上、依然として血行再建術の適応にならない上に、薬物療法ではコントロールできない症例は少なからず存在する。そこで新しい治療法としての血管新生療法に期待がよせられている。虚血性心疾患における血管新生療法とは、虚血部位における血管新生因子が既存の血管に作用して、ないしは、その部位で増加せしめられた血管新生因子により冠動脈側副血行路を発達させることを利用し、虚血心筋への血行を薬理的に再建する新しい方法である³⁾⁴⁾。

血管新生療法には細胞増殖因子の投与が試みられており、血管内皮細胞と血管平滑筋細胞を増殖せしめる線維芽細胞増殖因子 basic fibroblast growth factor (bFGF)⁵⁾、血管内皮細胞のみを増殖せしめる血管内皮細胞増殖因子 vascular endothelial growth factor (VEGF)⁶⁾、また最近では肝細胞増殖因子 hepatocyte growth factor (HGF)⁷⁾ などが注目されている。そしてこれまでに、急性あるいは慢性心筋虚血モデル、末梢虚血モデルなどで、bFGF や VEGF などの単独投与での血管新生効果が報告されてきた⁸⁾⁹⁾。bFGF と VEGF の併用により、毛細血管のみでなくより太い血管、すなわち細動脈以上の血管がより効果的に新生される可能性がある。その併用効果に関しては、*in vitro* で Goto らにより両者の併用投与によりウシ毛細血管の内皮細胞において、VEGF 単独に比し、管腔形成の増強効果が報告されているが¹⁰⁾、両者の併用についての、大型動物やヒトでの心筋梗塞に対する効果は明らかにされていない。とくに血行改善に重要な細動脈ないしはそれ以上太い血管の新生が単独よりも促進されるか否かについては明らかにされていない。さらに従来の血管新生効果の判定には、造影による判定法、組織標本による血管数での評価が行われているが¹¹⁾、はたしてそれが新しく生まれた血管か否かについては全く検討されていない。また、血管新生因子の投与方法も様々であり、安全かつ簡便に臨床応用可能な形として、また冠動脈の走行、心機能や合併症を考慮する必要がなく行え、加えて低侵襲

である投与方法が望まれる。

そこで本研究では、1) 従来死亡率が高かった開胸下でのイヌ急性心筋梗塞モデル作成に代わり、成功率が高く死亡率の少ない全く新しい心筋梗塞モデルを開発すること、2) 心筋内や冠動脈内投与という侵襲の大なる方法ではなく、低侵襲的な経静脈的心膜腔内投与によっても、bFGF と VEGF の投与により血管新生が促進されるか否かを検討すること、3) 併用により毛細血管のみでなくより太い血管が新生されるか否かを明らかにすること、4) 新生血管であることを明らかにすること、5) 血管新生が動脈側のみから起こるのか、静脈側のみから起こるのか、または両者から起こるのかを明らかにすることを目的とした。

II. 対象と方法

成犬 13 頭、(体重 12.8 ± 0.8 kg) を sodium pentobarbital 30 mg/kg の静脈内投与により麻酔し、気管内挿管後、空気による人工呼吸下 (200 ml, 20 回/分) で下記の実験をおこなった。

1. 経皮的急性心筋梗塞モデルの作成法

右総頸動脈を露出切開し、8F のカテーテルを挿入し、左室造影と左冠動脈造影を施行後、5F のカテーテルを用いて、直径 2 mm の吸水性高分子ポリマー (直径約 10 倍に膨張する) を左前下行枝の第一中隔枝と第一対角枝との間に選択的に留置することにより、左前下行枝を閉塞した。閉塞後に、lidocaine を 2 mg/kg 静脈内投与し、心室性不整脈の予防をおこなった。閉塞 30 分後、完全閉塞を確認後に左室造影を再施行した。なお側副血行が見られた例は除外した (Fig. 1)。

2. 薬物投与方法

完全閉塞を確認後、右大腿静脈を露出切開し、8F のカテーテルを挿入し、それを介し新たに開発した先端針付 5F カテーテルを用いて右心房自由壁を穿刺した。6 例については生理食塩水 2 ml に溶解した human recombinant bFGF (科研製薬社製) 100 μ g と VEGF (Sigma 社製) 10 μ g を心膜腔内へ選択的に投与し、治療群とした。投与量の設定に関しては、Goto らは bFGF と VEGF の併用比率を 10:1 とし、また bFGF 10 μ g 以上、VEGF では 1 μ g 以上の投与で血管新生が促進されるとしている。本研究の投与方法である心膜腔内

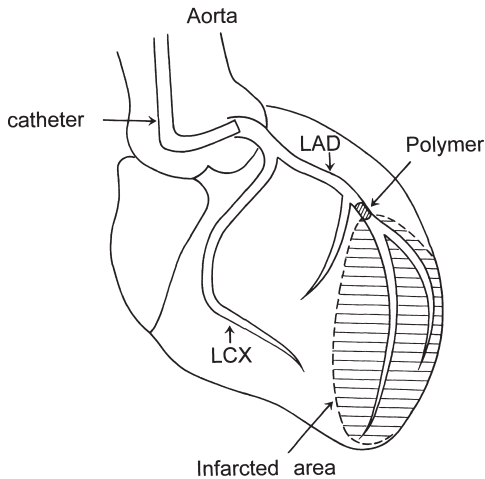


Fig. 1. Schematic representation of production of an acute myocardial infarction model.
LAD: left anterior descending artery
LCX: left circumflex artery

では、その吸収が低下する可能性があるため、それぞれを10倍量にしてbFGF 100 μ gとVEGF 10 μ gに設定した。なお、慢性実験であり、多数例を用いることが極めて困難であり、dose-responseを明らかにするための複数の投与量で

の検討は行えなかった。また生理食塩水2mlのみの投与群7例を非治療群とした。心膜腔内に注入されたことは、希釈造影剤を1ml (10% Iopami-ron[®]) 注入することにより確認した (Fig. 2)。

3. 実験結果の検討

2週間後、再度左室造影と冠動脈造影を施行した。ついで心臓を摘出し、10%ホルマリンで固定した。

左室造影画像を用い梗塞前、梗塞30分後、2週間後の左室駆出率 (LVEF) をCATHEX社製のCardiac 2000を使用し、area length法を用いて計測した。

固定2~3週間後、右室自由壁を切除し、長軸方向に垂直に10mm間隔で切片を作成し、個々の重量を測定した。ついでAzan染色を施した標本を用い、光顕上正常とみなされる心筋細胞が存在し、明らかに線維化のない部分を非梗塞域とし、心筋細胞が脱落し青色に染まる線維化の部分を梗塞域とみなし、その梗塞域面積をプランメトリーにより計測し、Simpson法により梗塞体積と非梗塞体積を求め、比重(1.05)を乗じ梗塞重量およびその梗塞重量比(梗塞重量/全重量)を算出した。各々

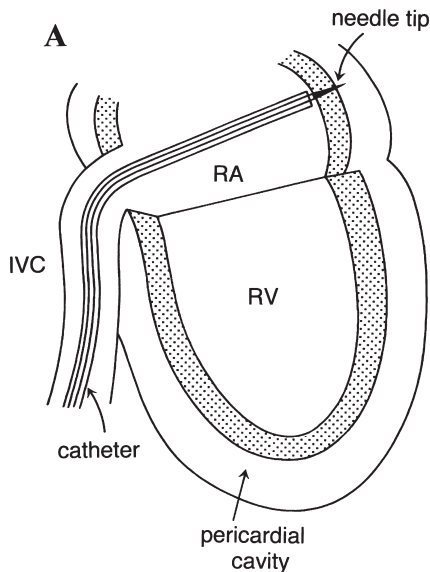


Fig. 2. Method for intrapericardial injection of angiogenic factors.
A; schematic representation of intrapericardial injection.
IVC: inferior vena cava, RA: right atrium, RV: right ventricle.
B; A X-ray film showing intrapericardial injection of contrast material for demonstration.
Arrow: needle tip.

の標本について、梗塞辺縁部において最も血管分布密度が大とみなした部位において単位面積 ($200 \times 300 \mu\text{m}^2$) 当りの血管数を、血管外径 $25 \mu\text{m}$ 未満で、内皮細胞のみで平滑筋を有さない単層構造のものを毛細血管とみなして計測した。さらに血管外径 $25 \mu\text{m}$ 以上 $100 \mu\text{m}$ 以下で球状の核を有する内皮細胞を有し平滑筋と外膜を有しているものを細動脈、扁平な核を有する内皮細胞と平滑筋を有し2層構造のものを細静脈として分類して計測した。なお細動脈に関しては、同時に血管壁厚比(血管外径-血管内径/血管外径)を計測した。

血管平滑筋細胞の胎児型 non muscular myosin heavy chain-B (SMemb) を、永井らは新生平滑筋細胞が主体であるとしている¹³⁾。そこで永井らの方法に従い、免疫染色をおこない、新生血管平滑筋細胞の指標として、単位面積 ($200 \times 300 \mu\text{m}^2$) 当りの SMemb 陽性細胞数を調べた。また、SMemb 陽性細胞を1個でも有していれば新生細動脈か細静脈とみなされるので、それぞれの分布が最も多いとみなした部位について単位面積当たりの数を計測した。

5. 統計学的解析

両群における、梗塞前、梗塞直後、梗塞2週後の左室駆出率、梗塞重量比、梗塞辺縁部における単位面積当りの血管数(細動脈、毛細血管、細静脈)、細動脈における血管壁厚比、および胎児型平滑筋細胞数については平均±標準誤差(mean±SE)で表示し、左室駆出率の比較や、他のデータについては *t*-検定を使用し、 $p < 0.05$ をもって有

意差ありとした。

III. 結 果

1. 急性心筋梗塞モデルの作成

経カテーテル的に心筋梗塞モデルを作成したが、2週間生存したものは13頭であったので、その13頭について検討した。

2. 梗塞前、梗塞30分後、梗塞2週後の左室駆出率

心筋梗塞前および梗塞30分後の左室駆出率は、2群間に有意差は認められなかったが、2週間後の左室駆出率は治療群 $42.7 \pm 2.2\%$ に対し、非治療群 $33.7 \pm 2.2\%$ と、治療群で有意 ($p < 0.05$) に改善していた (Fig. 3)。

3. 梗塞重量比

2群間で有意差は認められなかった。

4. 梗塞辺縁部における血管数 (Azan 染色)

治療群では著明な血管の増加がみられた (Fig. 4)。梗塞辺縁部における単位面積 ($200 \times 300 \mu\text{m}^2$) 当りの毛細血管数は治療群 55.8 ± 7.9 本に対し、非治療群 30.9 ± 2.6 本と、治療群においては有意 ($p < 0.01$) に多かった。細静脈数も治療群で有意に多かったが、細動脈数については2群間に有意差は認められなかったが治療群で多い傾向がみられた (Fig. 5-7)。

5. 細動脈血管壁厚比

血管壁厚比については2群間に有意差は認めなかった。

6. SMemb 陽性細胞数

梗塞域に散在する SMemb 陽性細胞は治療群

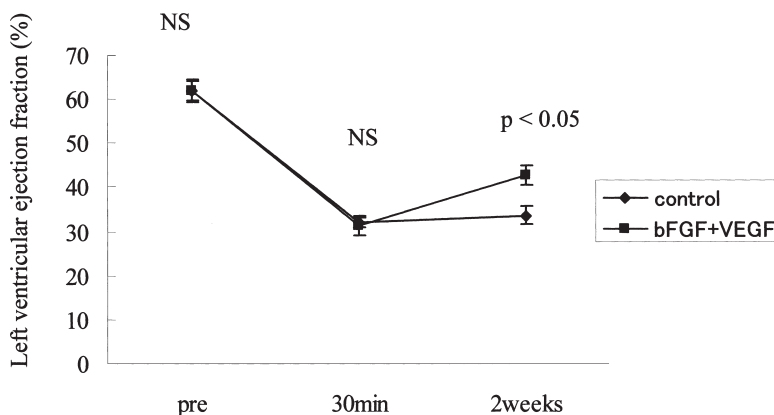


Fig. 3. Ejection fraction of the left ventricle at right anterior oblique projection before, 30 minutes after, and 2 weeks after myocardial infarction. NS; not significant.

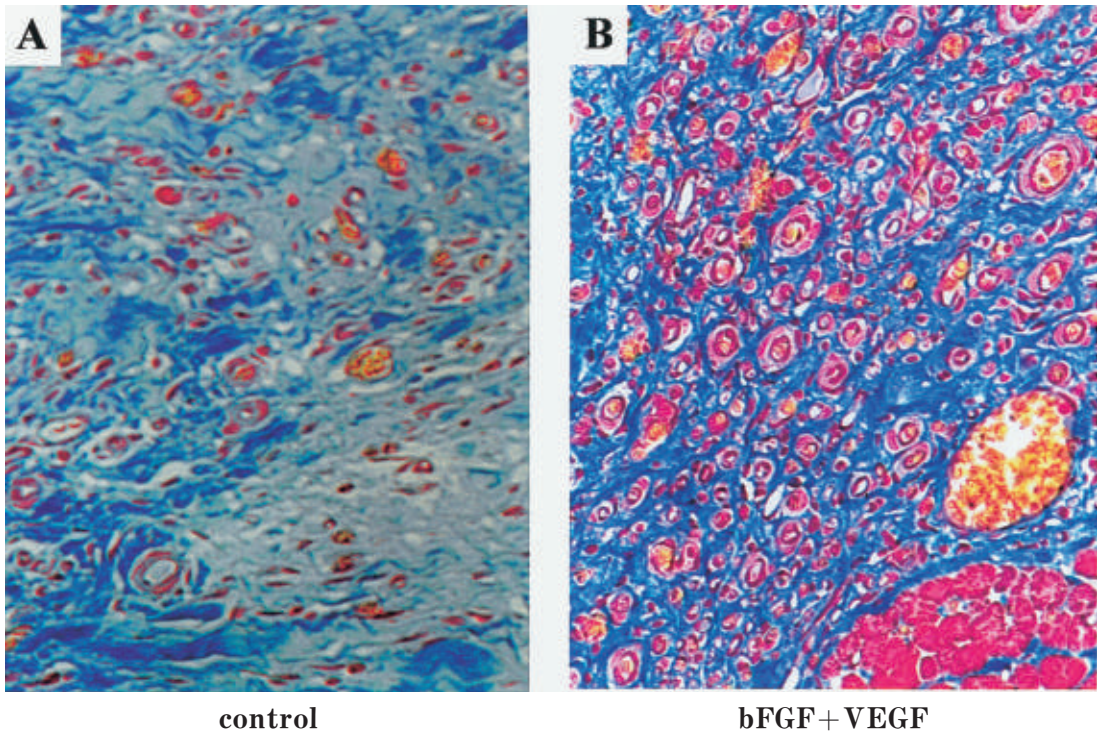


Fig. 4. Vessels in border zone of infarcted area.

A; control. B; bFGF+VEGF (Azan stain, $\times 400$)

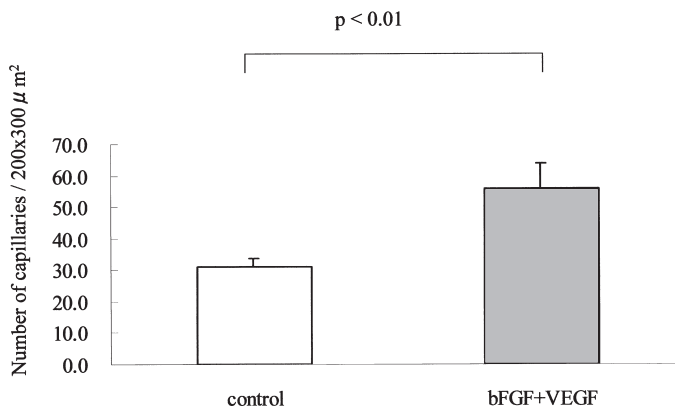


Fig. 5. Number of capillaries in the border zone of infarcted area.

で増加していた (Fig. 8). そのうち SMemb 細胞が明らかに血管壁に存在する血管を調べた. その結果細動脈および細静脈いずれにも SMemb 陽性細胞を有する血管が認められた (Fig. 9). SMemb 陽性細胞数は治療群 36.0 ± 4.4 個に対し, 非治療群 11.2 ± 0.5 個と, 治療群で有意に増加していた ($p < 0.01$) (Fig. 10).

梗塞辺縁部における単位面積 ($200 \times 300 \mu\text{m}^2$) 当りの SMemb 陽性細動脈数は治療群 0.9 ± 0.2 本に対し, 非治療群 0.2 ± 0.1 本と, 治療群で有意 ($p < 0.01$) に増加していた. SMemb 陽性細静脈数は治療群 1.6 ± 0.2 本に対し, 非治療群 0.3 ± 0.1 本と, 治療群で有意 ($p < 0.01$) に増加していた (Fig. 11, 12).

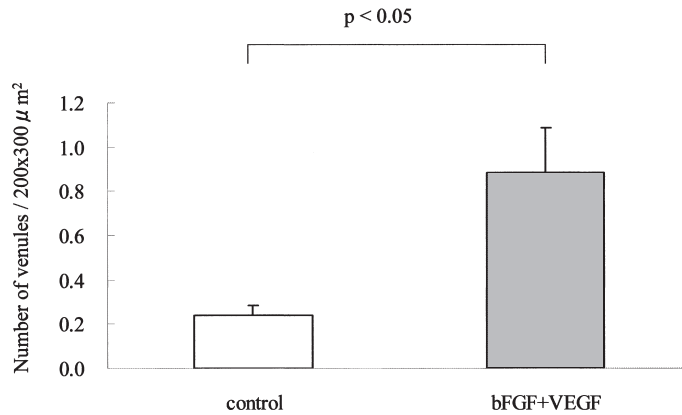


Fig. 6. Number of venules in the border zone of infarcted area.

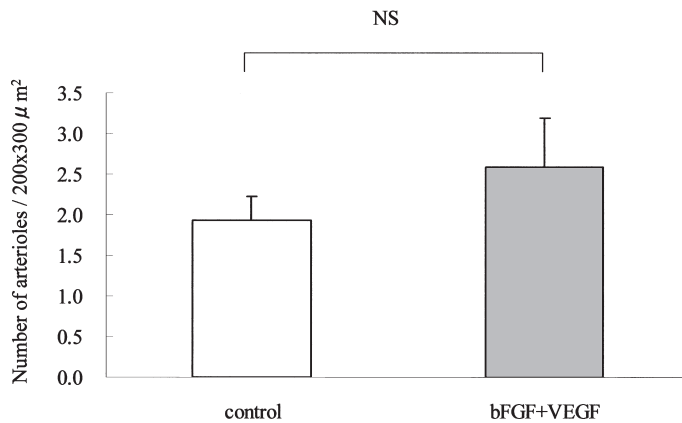


Fig. 7. Number of arterioles in the border zone of infarcted area.

IV. 考 察

血管新生因子を用いた血管新生療法としては、Yanagisawaらにより、イヌ急性心筋梗塞モデルにおいて、bFGFの冠動脈内投与により、梗塞後1週目における左室機能の改善と血管数の増加が得られることがはじめて報告された¹¹⁾。この報告をきっかけに、様々な血管新生因子を用いた多くの血管新生療法の基礎研究がおこなわれてきた。bFGFとともに血管新生への応用が最も研究されている血管新生因子はVEGFである。VEGFは血管内皮細胞に特異的な増殖因子である¹³⁾。VEGFの研究に関しては、ウサギ下肢虚血モデルで、500~1,000 μg の血管内単回投与により、側副血路の形成、血行動態の改善が血管造影上みられることがIsnerらにより報告された¹⁴⁾。虚血性

心疾患モデルへのVEGFの応用については、Banaiらによりはじめて報告された。彼らは、ameroid constrictorを用い、イヌの回旋枝領域に心筋梗塞を作成後、閉塞部より遠位部にカテーテルを留置し、1カ月間VEGF (45 μg /日)を冠動脈内投与したもので、治療1カ月後の梗塞部位の血流は非治療群に比し40%増加し、組織学的にも90%の血管数の増加を認めた⁹⁾が毛細血管と細動脈の区別については検討していない。

今回我々は、この2つの血管新生因子を併用投与し、血管新生効果を検討してみた。その結果、bFGFとVEGFの心膜腔内投与により、有意差をもって梗塞辺縁部における血管数の増加と左室駆出率の改善効果が確認された。増加数の主体は毛細血管であったが、細静脈も有意に増加しており、細動脈も増加傾向を示した。しかし、はたして

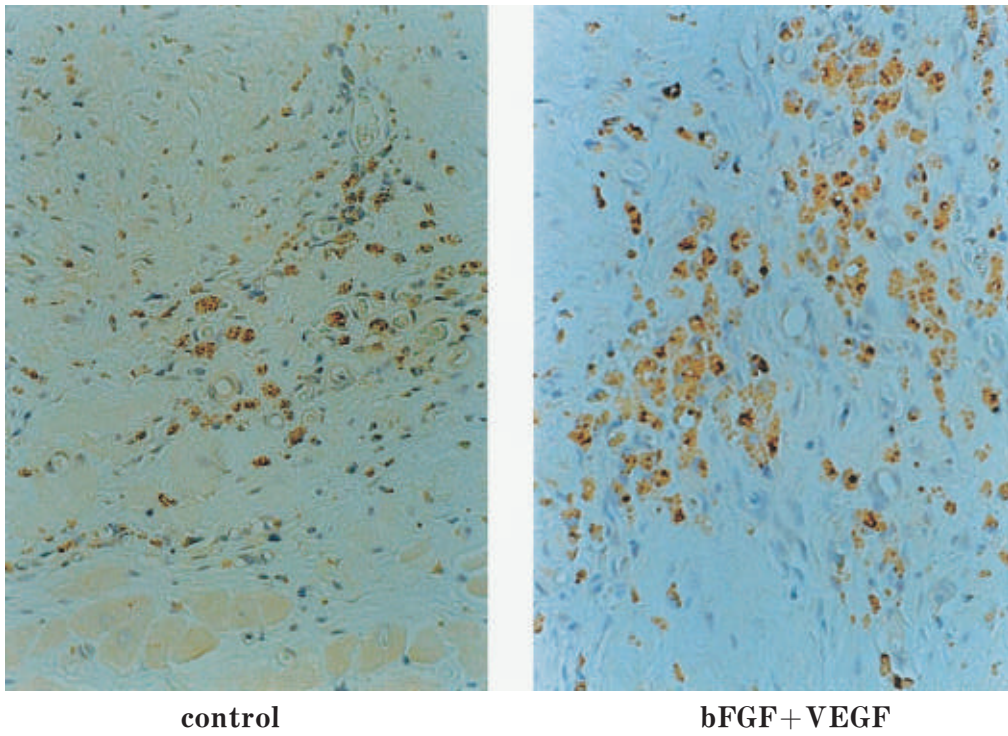


Fig. 8. SMemb positive cells in infarcted area.

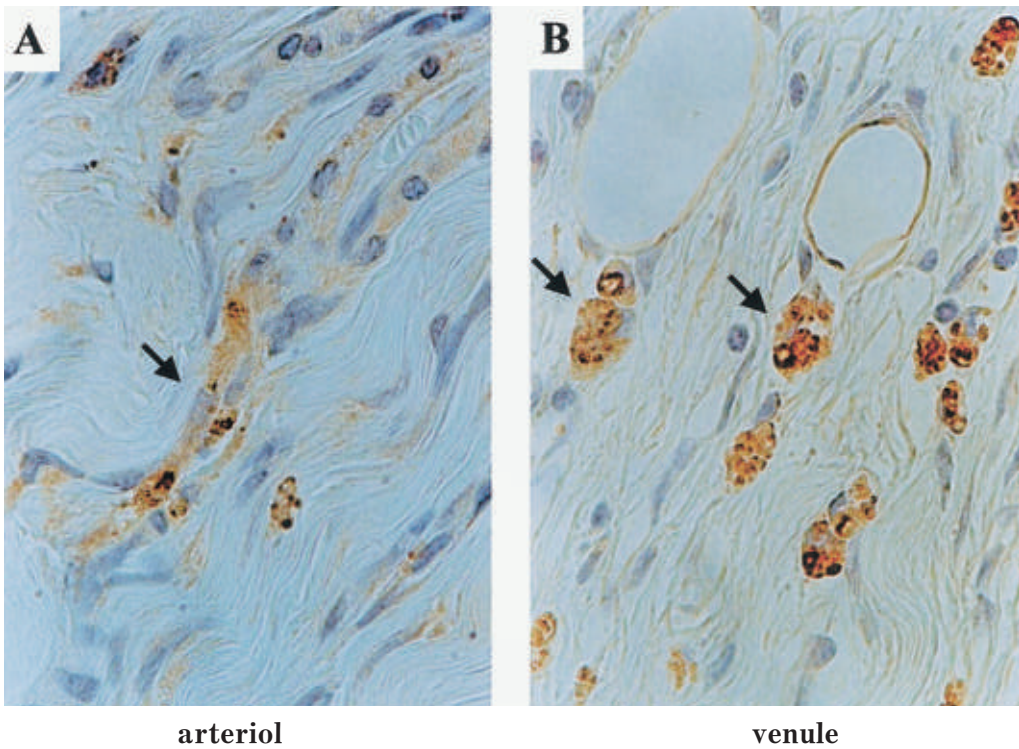


Fig. 9. Angiogenesis confirmed by SMemb stain
A; Angiogenesis from an arteriole. (arrow)
B; Angiogenesis from a venule. (arrow)

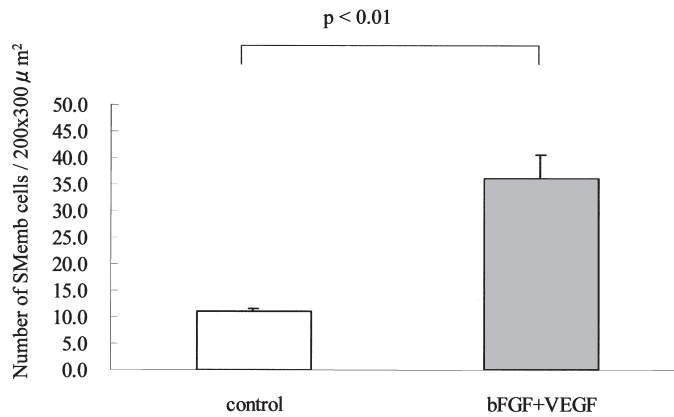


Fig. 10. Number of SMemb cells in the border zone of infarcted area.

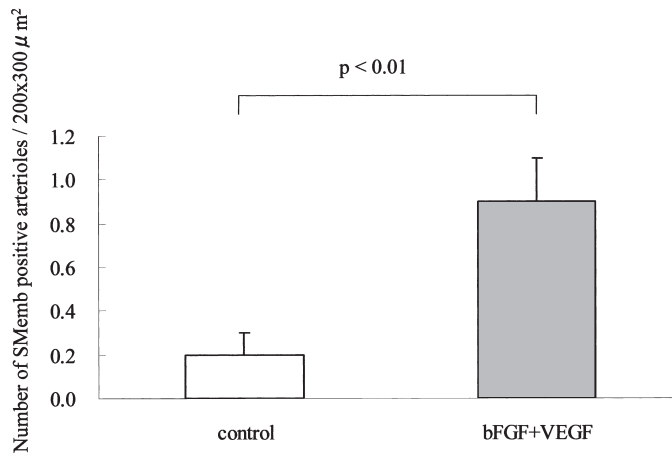


Fig. 11. Number of SMemb positive arterioles in the border zone of infarcted area.

bFGF 単独, VEGF 単独より増加するか否かについては今回検討できなかった。この点については今後検討する必要がある。また増加した血管が、果たして新生された血管か否かを明らかにする必要がある。アザン染色では、既存の血管を見ているのか、新生した血管であるのかの判別まではできない。そこで新生した血管平滑筋細胞の指標の一つであるとされている血管平滑筋胎児型 myosin heavy chain 陽性細胞を永井らの方法により染色してみた¹²⁾。その結果、梗塞辺縁部においては、SMemb 陽性細胞ならびに、それを有する細動脈と細静脈がいずれも治療群で有意に増加することが判明した。しかし、Azan 染色と胎児型血管平滑筋細胞の免疫染色において、各々の血管レベルにおける数差が生じた。これは、おそらく目的の違

いにより、観察部位の偏りが生じたものと考えられた。Azan 染色では、標本として全体の血管細胞の多い部位を選択しているのに対し、胎児型血管平滑筋細胞の免疫染色では、細動脈数の多い部位を選択しているという部位差から生じた可能性が示唆された。さらに胎児型平滑筋細胞は胎生期の血管、血管新生過程における未熟な血管や動脈硬化層内膜、冠動脈再狭窄病変部新生内膜等の病態で観察される合成型血管平滑筋細胞^{12)15)–17)}であり、したがって既存の血管には通常認められない胎児型平滑筋細胞を有する細動脈、細静脈が増加しているということは、新たに生まれた血管であることを示唆するものと考えられた。

本研究では、開胸という侵襲が加わることで、創傷などの修復に伴う成長因子の増加が与える影響

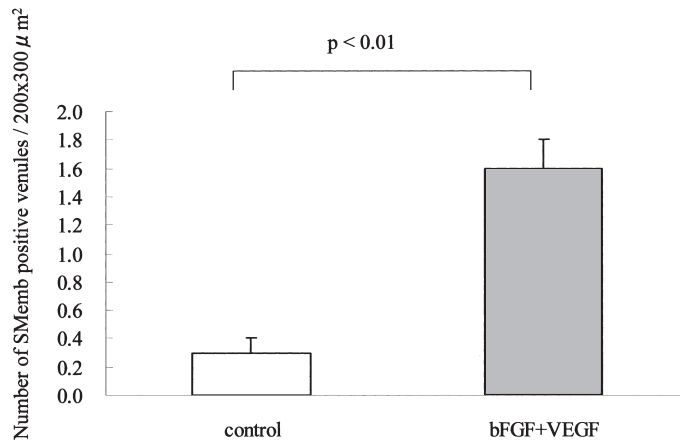


Fig. 12. Number of SMemb positive venules in the border zone of infarcted area.

を避けるため、侵襲の少ない非開胸下イヌ急性心筋梗塞モデルを開発し、それについて検討した。従来の研究では開胸下で行われているものがほとんどであり、開胸という侵襲の影響を除外できないので、本研究で用いた非開胸下心筋梗塞モデルのほうがより適切と考えられる。

血管新生因子の投与方法としては、これまでに冠動脈内、心筋内、心膜腔内投与等の報告がある^{18)–20)}。前述した Banai らの報告にある投与方法は、冠動脈閉塞部より遠位部にカテーテルを留置して投与しており、すくなくとも内科的には不可能であり、冠動脈閉塞部より近位部に投与するか、あるいは非閉塞血管に対して投与し、これらの血管から閉塞血管あるいは虚血存在部位への側副路発達を期待するしかない。十分に血管新生因子を目標部位に分布させることが可能で、さらに安全かつ簡便に臨床応用可能な形として、また冠動脈の病変の部位や程度にかかわらず使用可能であり、より侵襲が少ない方法と考えられる。この方法については Uchida らが初めてヒト bFGF を投与し検討している²¹⁾。最近、Laham らにより、ブタの慢性心筋虚血モデルにおいて、ウシ bFGF の心膜腔内投与による血管新生効果の増強が報告されている²²⁾。しかしながら VEGF 単独あるいは bFGF と VEGF の併用心膜腔内投与の報告はない。このことはいまだ検討されていないのはじめての試みであったが、心タンポナーデなどの合併症もなく、安全かつ簡便に投与可能であり、十分な血管新生効果がえられた。人口の高齢化に伴い、低

侵襲的治療法がますます望まれていることは、虚血性心疾患においても例外ではない。経カテーテル的に心筋内に注入したり、冠動脈内投与を行う方法は侵襲が高い方法であり、四肢、大動脈、冠動脈の病変により、経カテーテルの治療が困難な症例もしばしばみられる。今回検討した方法は、経静脈的に虚血部位にまんべんなく増殖因子を作用させる方法として、安全に施行可能であり、日帰りの治療法として、臨床的に大きな意義を有するものと考えられた。

従来、冠動脈閉塞時に側副血行路が、心筋を虚血あるいは壊死から防御するという報告は数多く知られている²³⁾。さらに我々の観察したような細い血管レベルでの新生血管が、従来の側副血行路と同様の灌流効果を果たするという報告もなされており²⁴⁾、梗塞辺縁部における毛細血管レベルの血管新生促進が、梗塞周辺領域の虚血の改善を介して、左室駆出率の改善につながった可能性が示唆される。梗塞重量比に有意差は認められず、光顕上、梗塞領域そのものの縮小効果が認められなかったことも、この可能性を支持するものと考えられる。Takeshita らは、下肢虚血モデルについて VEGF の投与から血管細胞の増殖が認められるまで 3~5 日、血管造影上の明らかな側副血行路の発達や血行動態の改善まで 7~10 日要したと報告している²⁵⁾²⁶⁾。今回の検討では、梗塞量が縮小していないにもかかわらず左室駆出率は改善していた。この機序として急性期の血管新生が関与しているとは考えにくい。しかし血管新生が起こって

いることから、bFGF や VEGF のもつ心筋細胞に対する急性期の心筋保護作用、アポトーシス抑制、血管拡張作用などが多少なりとも関与した可能性も否定できないが、血管新生により梗塞辺縁部に存在した、生存しているが収縮能を失っており血行改善により直ちに収縮能をとりもどす、いわゆる冬眠心筋が収縮能を回復し²⁷⁾、左室駆出率の改善につながった可能性が考えられる。

前述のごとく、bFGF の副作用として、過度の平滑筋細胞増殖による細動脈壁厚増大に伴う内腔狭窄の可能性も当初考えられたが、本研究では、否定的な結果であった。

これまでに、この2つの血管新生因子を中心に数多くの血管新生療法の有用性が報告され、すでに現在、ヒトレベルでの臨床治験の段階にある。虚血性心疾患の臨床試験として、Schumacher らは、冠動脈バイパス手術症例に対し、酸性FGF (aFGF) を内胸動脈一左前下行枝吻合部付近の心筋内に注入し、12 週後の血管造影により、心筋内投与周囲部における血管新生と、それらの新生血管を介した血流の改善効果を報告した²⁸⁾。また Laham らは冠動脈バイパス手術症例に、bFGF を含んだカプセルを心膜下に植え込み、虚血所見の改善効果を報告した²⁹⁾。Henry らは労作性狭心症患者の冠動脈内に VEGF を投与して、約半数の患者にタリウム心筋シンチグラムによる虚血の改善を認め、さらに冠動脈造影をした7割に側副血行路の発達を認めたと報告している³⁰⁾。Uchida らは拡張型心筋症例に bFGF を冠動脈内投与し、収縮能の改善と血管増加をみた例を報告している³¹⁾。また遺伝子を導入したものでは、Isner らのグループは労作性狭心症患者を対象に、全身麻酔下に胸壁に小切開を加え VEGF プラスミドを心筋内に注入し、1~2 カ月の経過で SPECT による心筋虚血の改善と冠動脈造影による側副路の発達を報告している³²⁾。

最近 HGF (hepatocyte growth factor) も注目されている。HGF は血管系において、血管平滑筋細胞増殖に影響を与えず、VEGF と同様内皮細胞のみを増殖させる血管内皮特異的増殖因子である⁷⁾。これまでに、ウサギ下肢虚血モデルでの、血管造影上の血管新生所見、組織学的な虚血の改善の報告がされている³³⁾。しかしながら、内皮細胞の

みでは毛細血管は増加するが、細動脈の増加ははかれない可能性がある。なぜならば、血管平滑筋細胞を直接増殖せしめないからである。心筋細胞を生存させておくには、1g あたり 0.1 ml/分の血流があれば良いが、運動耐容能を正常に保つほどの血流改善には細動脈以上の太い血管の新生が必要である。本研究では、内皮細胞のみでなく、平滑筋細胞も増殖せしめる bFGF と内皮細胞増殖作用のみを有している VEGF を併用したが、毛細血管のみでなく、SMemb 陽性細動脈の有意な増加がみられたことは、bFGF と VEGF 併用の効果によるものとも考えられた。しかし、これまでの bFGF や VEGF の単独投与でも太い血管の増加の報告があり、併用投与が単独投与よりも優れたものであると結論づけることはできない。これについては、投与経路の差異による差なのか、投与量による差なのかを明らかにするために、投与量、併用の割合、投与回数などを変えて、さらに検討を加える必要がある。そのうえで、運動耐容能を十分に改善せしめるに必要な細動脈以上の血管を優先的に新生せしめる方法を確立する必要がある。

V. 結 語

新たに開発した非開胸下イヌ急性心筋梗塞モデルを用い、経静脈的に心膜腔内への bFGF と VEGF の併用投与をおこなった。その結果、梗塞辺縁部における血管新生促進と左室機能の改善効果が認められた。この方法は、低侵襲的血管新生療法として臨床的にも応用可能と判断された。

稿を終えるにあたり御指導、御校閲を賜った望月正武教授に感謝の意を表すと共に、本研究において絶えず実験の御指導、御助言、研究費の支給を頂きました内田康美客員教授に深く感謝申し上げます。併せて本研究に御協力下さった。東京慈恵会医科大学循環器内科、関口博仁、後藤 豊、青木和弘、古賀 純、松山明正諸先生、同大学動物実験施設、岩城隆昌、成相孝一、本村岩男先生、東京大学腎臓内科、内田晴子先生に厚く御礼申し上げます。尚、本論文の要旨は 2000 年 7 月の第 6 回日本血管内治療学会（東京）において発表した。

文 献

- 1) ACC/AHA Task Force Members. Guidelines for percutaneous transluminal coronary angioplasty. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on assessment of diagnostic and therapeutic cardiovascular procedures (Committee on Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty). *J Am Coll Cardiol* 1993; 22: 2033-54.
- 2) ACC/AHA Task Force Members. Guidelines for percutaneous transluminal coronary angioplasty. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on assessment of diagnostic and therapeutic cardiovascular procedures (Subcommittee on Coronary Artery Bypass Graft Surgery). *J Am Coll Cardiol* 1991; 17: 543-89.
- 3) Hockel M, Schlenger K, Doctrow S, Kissel T, Vaupel P. Therapeutic angiogenesis. *Arch Surg* 1993; 128: 423-9.
- 4) Folkman J. Angiogenic therapy of the human heart. *Circulation* 1998; 97: 628-9.
- 5) Rifkin DB, Moscatelli D. Recent development in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol* 1989; 109: 1-6.
- 6) Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvork AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146: 1029-39.
- 7) Nakamura Y, Morishita R, Higaki J, Kida I, Aoki M, Moriguchi A, et al. Hepatocyte growth factor is a novel member of the endothelium specific growth factor: additive stimulatory effect of hepatocyte growth factor with basic fibroblast growth factor but not with vascular endothelial growth factor. *J Hypertens* 1996; 14: 1067-72.
- 8) Unger EF, Banai S, Shou M, Lazarous DF, Jaklitsch MT, Scheinowitz M, et al. Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in a canine model. *Am J Physiol* 1994; 266: H1588-95.
- 9) Banai S, Jalitsch MT, Shou M, Lazarous DF, Scheinowitz M, Biro S, Epstein SE, et al. Angiogenesis induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation* 1994; 89: 2183-9.
- 10) Goto F, Goto K, Weindel K, Folkman J. Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest* 1993; 69: 508-17.
- 11) Yanagisawa-Miwa A, Uchida Y, Nakamura F, Tomaru T, Kido H, Kamijo T, et al. Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor. *Science* 1992; 257(5075): 1401-3.
- 12) Aikawa M, Sivan PN, Kuro-o M, Nakahara K, Takewaki S, Ueda M, Yamaguchi H, Yazaki Y, Periasamy M, et al. Human smooth muscle myosin heavy chain isoforms as molecular markers for vascular development and atherosclerosis. *Circ Res* 1993; 73: 1000-12.
- 13) Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246.
- 14) Takeshita S, Pu LQ, Stein LA, Sniderman AD, Bunting S, Ferrara N, et al. Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induces dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia. *Circulation* 1994; 90: II228-II34.
- 15) Nagai R, Larson DM, Periasamy M. Characterization of a mammalian smooth muscle myosin heavy chain cDNA clone and its expression in various smooth muscle types. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 1047-51.
- 16) Kuro-o M, Nagai R, Tsuchimochi H, Katoh H, Yazaki Y, Ohkubo A, et al. Developmentally regulated expression of vascular smooth muscle myosin heavy chain isoforms. *J Biol Chem* 1989; 264: 18272-5.
- 17) Nagai R, Kuro-o M, Babij P, Periasamy M. Identification of two types of smooth muscle myosin heavy chain isoforms by cDNA cloning and immunoblot analysis. *J Biol Chem* 1989; 264: 9734-7.
- 18) Landau C, Jacobs AK, Haudenschild CC. Intrapericardial basic fibroblast growth factor induces myocardial angiogenesis in a rabbit model of chronic ischemia. *Am Heart J* 1995; 129: 924-31.
- 19) Lopez JJ, Laham RJ, Stamler A, Pearlman JD,

- Bunting S, Kaplan A, et al. VEGF administration in chronic myocardial ischemia in pigs. *Cardiovasc Res* 1998 ; 40 : 272-81.
- 20) Rosengart TK, Patel SR, Lee LY, Hachamovitch R, Kligfield PD, Isom OW, et al. Safety of direct myocardial VEGF121cDNA adenovirus-mediated angiogenesis gene therapy in conjunction with coronary bypass surgery. *Circulation* 1998 ; 98 : I-321.
 - 21) Uchida Y, Yanagisawa-Miwa A, Nakamura F, Yamada K, Tomaru T, Kimura K, et al. Angiogenic therapy of acute myocardial infarction by intrapericardial injection of basic fibroblast growth factor and heparan sulfate: an experimental study. *Am Heart J* 1995 ; 130 : 1182-8.
 - 22) Laham RJ, Rezaee M, Novicki DL, Sellke FW, Hung D, Simons M. A single intrapericardial dose of growth factor induces functional angiogenesis in porcine model of chronic myocardial ischemia. *Circulation* 1998 ; 98 (Suppl I) : I-794.
 - 23) Sabri MN, Disciascio G, Cowley M, Alpert D, Vetrovec GW. Coronary collateral recruitment: functional significance and relation to rate of vessel closure. *Am Heart J* 1991 ; 121 : 876-80.
 - 24) Unger EF, Scheffield CD, Epstein SE. Creation of anastomoses between an extracardiac artery and the coronary circulation. *Circulation* 1990 ; 82 : 1449-66.
 - 25) Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, et al. Therapeutic angiogenesis: a single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest* 1994 ; 93 : 662-70.
 - 26) Takeshita S, Rossow ST, Kearney M, Zheng LP, Bauters C, Bunting S, et al. Time course of increased cellular proliferation in collateral arteries after administration of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of lower limb vascular insufficiency. *Am J Pathol* 1995 ; 147 : 1649-60.
 - 27) Braunwald F, Kloner R. The stunned myocardium: Prolonged, post ischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 1982 ; 66 : 1146-9.
 - 28) Schumacher MD, Pecher MD, von Specht BU, Stegmann T. Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary artery disease. *Circulation* 1998 ; 97 : 645-50.
 - 29) Laham RJ, Sellke FW, Edelman ER, Pearlman JD, Simons M. Local perivascular basic fibroblast growth factor treatment in patients with ischemic heart disease. *J Am Coll Cardiol* 1998 ; 31(Suppl A) : 394A.
 - 30) Henry TD, Rocha-Singh K, Isner JM, Kerelaikes DJ, Giordano FJ, Simons M, et al. Results of intracoronary recombinant human vascular endothelial growth factor administration trial. *J Am Coll Cardiol* 1998 ; 31(Suppl A) : 65A.
 - 31) Uchida Y. *Coronary angioscopy*. NY: Future Publishing Co; 2000. p. 160.
 - 32) Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Maysky M, et al. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF₁₆₅ as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 1998 ; 98 : 2800.
 - 33) Morishita R, Nakamura S, Hayashi S, Taniyama Y, Moriguchi A, Nagano, et al. Therapeutic angiogenesis induced by human recombinant hepatocyte growth factor in rabbit hind limb ischemia model as cytokine supplement therapy. *Hypertension* 1999 ; 33 : 1379-84.