

平成21年 5月25日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19500379  
 研究課題名（和文） 新たなbFGFアガロース徐放剤を用いた人工血管治癒促進・吻合部狭窄  
 予防の基礎研究  
 研究課題名（英文） Healing of Dacron graft: role of bFGF and extracellular matrix using  
 agarose hydrogel particles as a controlled release reservoir  
 研究代表者  
 石田 厚 （ISHIDA ATSUSHI）  
 東京慈恵会医科大学・医学部・講師  
 研究者番号： 70334183

研究成果の概要： 初年度に大型犬の頸動脈に人工血管を移植する実験モデルを確立した。人工血管に塗布した徐放型塩基性線維芽増殖因子は人工血管治癒にプラスまたはマイナスに働くという従来の結果に対し、今回の結果は、吻合部の内膜肥厚を起こし、人工血管治癒には貢献していないか、マイナスに働いていた。一方、人工血管周囲に塗布した細胞外マトリックスの組み合わせは、コントロールと比較し、明らかに人工血管治癒に貢献していた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 総合領域

科研費の分科・細目： 人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード： 人工血管、徐放剤、内膜肥厚、再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 実用化を念頭において新たな人工血管の開発を行う場合、現状では、Dacron または ePTFE を素材とし、耐久性も問題ないデザインを採用せざるを得ない。現在の再生医療の応用も踏まえ、人工血管内腔の内皮化・人工血管自体への自己組織の誘導促進目的にて、porosity の大きい人工血管をデザインした場合、前述の理由から、Dacron 人工血管を

採用せざるを得ない。しかし、Dacron 人工血管は内皮細胞の増殖を抑制するマクロファージ TGF- $\beta$  の分泌を刺激するという *in vitro* データ (Greisler HP, et al, Cardiovasc Surg, 4, 169-73, 1996) があり、人工血管のデザインに工夫を要する。

(2) 人工血管開存の大きな障害になる因子に吻合部における内膜肥厚すなわち吻合部狭窄の問題がある。小口径人工血管の開発も吻合部狭窄・内膜肥厚の問題を克服出来な

ればうまくいかない。ゼラチンやコラーゲンでコーティングした zero porosity の Dacron 人工血管が開発された (Drury JK, et al, Ann Vasc Surg, 1, 542-7, 1987) が、今のところ人工血管の内腔の十分良好な内皮化や吻合部における内膜肥厚の抑制は報告されていない。

(3) 冠動脈狭窄病変の血管内治療に用い、良好な成績を得ているドラックエリユーティングステントに用いられている Rapamycin を接着性のポリマーを用い吻合部近くの人工血管内にコーティングした ePTFE 人工血管内では、4週間後の吻合狭窄が有意に抑えられたという報告がある (Cagiannos C, et al, J Vasc Surg, 42, 980-8, 2005)。しかし、あるべき細胞の増殖をも抑制する戦略は、人工血管の長期観察において成功するかどうかは不明である。

(4) 塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) は、昨今の下肢虚血に対する血管新生療法に蛋白または遺伝子で用いられている。一方、bFGF は、繊維芽細胞に対する増殖因子であり、吻合部狭窄を起こす内膜肥厚増殖因子とも考えられる。実際、porosity の小さい ePTFE 人工血管における研究では、血小板由来増殖因子 (PDGF-BB) とともに吻合部狭窄を増悪させたり (Sapienza P, et al, J Surg Res, 75, 24-9, 1998)、抗 bFGF 抗体を用いた実験では吻合部狭窄を抑制する (Randone B, et al, Eur J Endovasc Surg, 16, 401-7, 1998) という報告がある。しかし、一方では、bFGF とヘパリンを含んだフィブリンのりを用い内膜肥厚を起こさず、人工血管の毛細血管発達・内皮化促進するという報告 (Gray JL, et al, J Surg Res, 57, 596-612, 1994) もあり、bFGF の人工血管治癒促進・吻合部狭窄に対する作用は、未だ確定的ではない。問題は、使用する人工血管、動物モデル、bFGF の投与方法が一定せず、各報告を比較検討することが出来ないことである。文献的には、前述のフィブリンのりを用いた実験以外、bFGF を徐放化して用いた報告は見つけられなかった。

(5) 筆者は、当大学大学院薬学研究院製剤工学研究室の森部久仁一助教授のグループと約3年に渡り、27-29G の皮内針、スプレーでも使用出来る、非動物由来材料を用いた微粒子型 bFGF アガロース徐放剤の設計・開発を行ってきた。最近、マウスによる *in vivo* 実験で、田畑泰彦博士のグループが既に開発し、種々の生体組織の再生に動物実験で成功し、一部は臨床治験の段階に入っている bFGF ゼラチンハイドロゲル微粒子をコントロールとし、同等以上の bFGF の活性を3週間以上示すデータを得た (Pharm Dev Technol, 13, 541-547, 2008)。しかも、徐放型のため、bFGF の初期投与量は、over dose を気にすることなく十分量で使用開始可能で容量設定の必

要性が低いと思われる。

(6) 本実験に使用予定の人工血管は、通常の Dacron 人工血管 Gelsoft Plus<sup>®</sup> の porosity (water integral permeability) 2,500ml/min/cm<sup>2</sup> に対し、2006年6月 Vascutek 社訪問の際、私の研究の趣旨をご理解頂いた Research & Development Director の T. R. Ashton 氏から提供頂いた、口径 6mm Dacron 人工血管 Gelsoft Plus thin wall<sup>®</sup> は、porosity が、現在、耐久性を考慮し考えられる最も大きな 3,500ml/min/cm<sup>2</sup> で通常の Dacron 人工血管の porosity より約 40% 大きい。この人工血管は、porosity と共に、compliance も従来のもより大きく、より人工血管の開存性を向上出来る可能性があり、小口径人工血管への応用が可能なデザインを有した人工血管と思われる。

(7) 最後に、筆者は、1996年3月より2001年1月まで、Dacron 人工血管の生みの親とも言うべき Dr. Lester R. Sauvage が主宰する米国ホープ心臓研究所で、最初の2年間は実験血管外科部門の血管外科フェローとして犬への人工血管移植実験研究を行い、その後約3年間は血管生物学部門の研究スタッフとして、人工血管の治癒機転、骨髄細胞由来の内皮前駆細胞、そして、組織工学をめざした血管生物学の基礎研究を行ってきており、今回の研究に際して必要な大型犬への人工血管移植実験、その標本の評価、そして、分子生物学的解析法も経験してきている。更に、科学研究費補助金基盤研究 (C) 課題番号 16500286 (平成16年度~平成17年度)、研究課題「臨床応用をめざした、組織工学を応用した小口径人工再生血管開発のための基礎研究」にて、PTFE 表面を各種細胞外マトリックス (ECM) にてコーティングし、G-CSF 動員ヒト末梢血単核細胞群を播種、一定期間培養の後、末梢血単核細胞群の生着・増殖を定量評価した *in vitro* 実験で、有用な ECM の組み合わせを見出した。この結果を、本研究に応用し、high porosity Dacron 人工血管の「すきま」を徐放型 bFGF と ECM により誘導した自己の細胞・組織で埋め、人工血管内腔の内皮化・人工血管自体の自己組織化を促進したいと考えている。

## 2. 研究の目的

今回の研究のために準備した「非動物由来材料の新たな bFGF アガロース微粒子徐放剤」「より大きな porosity を有した Dacron 人工血管」を使用し、本研究では、  
目標 (1) 新たな high porosity Dacron 人工血管を用いた大型犬移植実験系を確立する、  
目標 (2) 犬モデルに新たに開発した bFGF アガロース微粒子徐放剤を投与し、人工血管

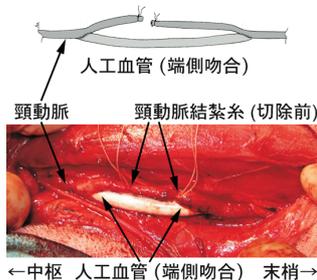
治癒促進・吻合部狭窄の効果を評価する、目標（3）更に、bFGF アガロース微粒子徐放剤と細胞外マトリックス（ECM）を組み合わせ、再度人工血管治癒促進・吻合部狭窄の効果を評価する、を研究目的とした。

### 3. 研究の方法

#### （1）大型犬人工血管移植実験モデルの確立

体重約 20-23kg の大型犬を静脈全身麻酔下に仰臥位とし、頸部を剃毛した後に、イソジン消毒し、頸部正中切開にて両側頸動脈を露出し、ヘパリン 2cc iv し、口径約 3-4mm の頸動脈を遮断した後に、頸動脈に、約 1cm 長の縦切開を加え、口径 6 mm、長さ 6 cm の high porosity Dacron 人工血管 (Gelsoft Plus thin wall®) < porosity (water integral permeability)  $3,500\text{ml}/\text{min}/\text{cm}^2$  > を 6-0 monofilament 糸連続縫合にて中枢・末梢の順で端側吻合した。長さ 6 cm は、開存性を論じられる Journal of Vascular Surgery の人工血管効果判定ガイドライン (Abbott WM, et al, J Vasc Surg, 17, 746-56, 1993) に従った。止血を得た後に頸動脈本幹の人工血管と並列になった部分を 2 箇所にて結紮し、実際の臨床の動脈閉塞疾患に対するバイパス手術と同じ条件のモデルにした。

模式図と写真を次に示す。



#### （2）移植人工血管に新たに開発した bFGF アガロース微粒子徐放剤の塗付

移植人工血管に溶解した bFGF 約 1mg をアガロース微粒子徐放剤に吸収させ、フィブリンのり（ベリプラスト P®）の A 液に混合し、スプレー式ベリプラスト調整器セットを使用し、移植した人工血管表面および吻合部近くの頸動脈表面に塗付する。こうすることにより、bFGF アガロース微粒子徐放剤を混合したフィブリンのりが、投与されることになる。

#### （3）bFGF アガロース微粒子徐放剤と細胞外マトリックス（ECM）を組み合わせ

移植人工血管に溶解した bFGF 約 1mg をアガロース微粒子徐放剤に吸収させ、フィブリン

のり（ベリプラスト P®）の A 液に混合、筆者の科学研究費補助金基盤研究（C）課題番号 1650.0286（平成 16 年度～平成 17 年度）研究目的（2）で得たデータをもとに、*in vitro* 実験において末梢血単核細胞群の生着・増殖効率の良かった「1 型コラーゲン + Fibronectin GRGD peptide + Vitronectin」、「Fibronectin + Vitronectin」を細胞外マトリックス（ECM）として B 液に混合し、スプレー塗付する。それにより塗付面でフィブリンのりが固まる際に、bFGF アガロース微粒子徐放剤と細胞外マトリックス（ECM）が混合固定され、移植人工血管に作用する。

#### （4）人工血管治癒促進・吻合部狭窄の効果の病理学的評価

約 5 週間の人工血管移植の後、移植人工血管を取り出し、人工血管の開存性、人工血管全体の外面および内腔面の肉眼的評価（人工血管治癒状態の把握）、頸動脈を含む吻合部・人工血管の肉眼的および病理学的評価（Hematoxylin and eosin 染色、Elastic van Gieson 染色、そして vWF 抗体・alpha-Actin 抗体・bFGF 抗体による組織染色）、非吸収型徐放剤として用いたアガロース微粒子の動態の確認等を行った。

### 4. 研究成果

本研究は、大型動物モデルを使用した研究であり、小動物を用いた多くのサンプルを作成し、統計処理により、解析を進める手法は適切ではなく、費用・時間の制約から、1 つ 1 つの症例のサンプルを検討するという現実的な手法に依らざるを得ない研究である。従って、目標（1）新たな high porosity Dacron 人工血管を用いた大型犬移植実験系を確立する、の後の、目標（2）犬モデルに新たに開発した bFGF アガロース微粒子徐放剤を投与し、人工血管治癒促進・吻合部狭窄の効果を評価する、と（3）更に、bFGF アガロース微粒子徐放剤と細胞外マトリックス（ECM）を組み合わせ、再度人工血管治癒促進・吻合部狭窄の効果を評価する、を完遂するために、以下の目標（2）と（3）を組み合わせた実験計画をたてた（表 1）。

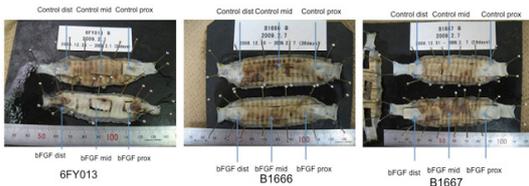
表 1

部位	右頸動脈			左頸動脈			移植期間 (日)	
	フィブリンのり	A 液	B 液	フィブリンのり	A 液	B 液		
実験1	dog	ゼラチンハイドロゲル微粒子	bFGF 1mg	細胞外マトリックス	ゼラチンハイドロゲル微粒子	bFGF 1mg	細胞外マトリックス	35
実験2	B1666	+	+	1型コラーゲン+ Fibronectin GRGD peptide+ Vitronectin	+	-	1型コラーゲン+ Fibronectin GRGD peptide+ Vitronectin	39
実験3	B1667	+	+	Fibronectin + Vitronectin	+	-	Fibronectin + Vitronectin	38

すなわち、目標（2）を実験1・2・3の組み合わせ、目標（3）を実験1と実験2・3の結果を比較することにより検討した。

（1）開存性の確認（表2）

実験1（6FY013）・2（B1666）・3（B1667）により作成したホルマリン固定した人工血管内腔面の標本写真を示す。白色調の部分は総じて治癒が良好な部分が多く、暗赤色調の所は血栓の付着が多い部分である。



bFGF アガロース微粒子徐放剤を塗付した実験1の中枢・末梢の両人工血管吻合部は著明に肥厚し閉塞していた。他の標本では、吻合部の著明な肥厚は認めず、開存していた（表2）。

表2

	dog	移植期間 (日)	bFGF	
			+ (右頸動脈)	- (左頸動脈)
実験1	6FY013	35	閉塞	開存
実験2	B1666	39	開存	開存
実験3	B1667	38	開存	開存

（2）bFGF アガロース微粒子徐放剤の人工血管治癒に対する効果（目標2）（表2・3・4）

肉眼所見だけでは、人工血管治癒の優位性ははっきりしなかった。病理学的評価（Hematoxylin and eosin 染色、Elastica van Gieson 染色、そしてvWF抗体・alpha-Actin抗体・bFGF抗体による組織染色）のまとめを表3・4に示す。

表3

	dog	細胞外マトリックス	人工血管部位	一般染色			
				Hematoxylin and eosin染色		Elastica van Gieson染色	
				bFGF (+)	bFGF (-)	bFGF (+)	bFGF (-)
実験1	6FY013	-	中枢吻合部	著明肥厚	やや肥厚	++	+
			人工血管中央	治癒不良	やや治癒	-	-
			末梢吻合部	著明肥厚	やや肥厚	++	+
実験2	B1666	1型コラーゲン+ Fibronectin GRGD peptide+ Vitronectin	中枢吻合部	治癒良好	治癒良好	++	++
			人工血管中央	治癒不良	部分的に治癒	-	-
			末梢吻合部	やや肥厚	やや肥厚	++	+
実験3	B1667	Fibronectin+ Vitronectin	中枢吻合部	治癒良好	治癒良好	++	++
			人工血管中央	部分的に治癒	全体に治癒良好	-	-
			末梢吻合部	やや肥厚	やや肥厚	++	++

—: 陰性、+：わずかな細胞で陽性、++：多くの細胞で陽性

表4

	dog	細胞外マトリックス	人工血管部位	組織染色					
				vWF抗体		alpha-Actin抗体		bFGF抗体	
				bFGF (+)	bFGF (-)	bFGF (+)	bFGF (-)	bFGF (+)	bFGF (-)
実験1	6FY013	-	中枢吻合部	-	++	++	+++	-	-
			人工血管中央	-	++	-	+++	-	-
			末梢吻合部	-	++	+++	+++	-	-
実験2	B1666	1型コラーゲン+ Fibronectin GRGD peptide+ Vitronectin	中枢吻合部	++	+	+++	++	-	-
			人工血管中央	-	+	++	-	-	++
			末梢吻合部	+	+	+++	++	-	+
実験3	B1667	Fibronectin+ Vitronectin	中枢吻合部	++	++	++	++	-	-
			人工血管中央	-	+	+	++	++	++
			末梢吻合部	+	++	++	+	-	+

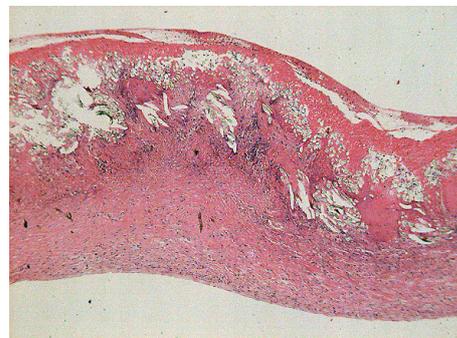
—: 陰性、+：わずかな細胞で陽性、++：多くの細胞で陽性、+++：ほとんどの細胞で陽性、強陽性

Hematoxylin and eosin 染色の結果では、同じアガロース微粒子を筋肉内投与した4週間のマウス血管新生実験において組織内に確認出来たのとは違い、bFGF徐放剤用のアガロース微粒子は人工血管周囲には確認出来なかった。

徐放型 bFGF は人工血管治癒にプラス、マイナスに働くという異なった従来の結果に対し、今回の実験結果は、「吻合部」の内膜肥厚を起こし、「人工血管中央部」の治癒に貢献していなかった。すなわち、Dacron人工血管の治癒には貢献していないか、マイナスに働いていた。

（3）bFGF アガロース微粒子徐放剤と細胞外マトリックス（ECM）を組み合わせによる人工血管治癒に対する効果（目標3）（表2・3・4）

表3・4の結果から、細胞外マトリックスは、吻合部肥厚の抑制に働き、細胞外マトリックスの組み合わせ「1型コラーゲン+ Fibronectin GRGD peptide+ Vitronectin」「Fibronectin+ Vitronectin」は、細胞外マトリックスを塗付していないコントロールと比較し、明らかに治癒が進んでいた。特に、「Fibronectin+ Vitronectin」のECMの組み合わせは、良好な人工血管治癒を認めた（下：Hematoxylin and eosin 染色標本写真参照。下方が血管内腔面）。



まとめ: Dacron 人工血管の治癒促進には徐放型 bFGF は不要で、「Fibronectin+ Vitronectin」が治癒促進の1つの有用な ECM 組み合わせと思われる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

①石田厚、大木隆生、特集 透析患者における循環器合併症ガイドラインを考える IV 透析患者のおもな循環器合併症、臨床透析、24、67-72、2008、無

②Moribe, K., Nomizu, N., Izukura, S., Yamamoto, K., Tozuka, Y., Sakurai, M., Ishida, A., 他, Physicochemical, morphological and therapeutic evaluation of agarose hydrogel particles as a reservoir for basic fibroblast growth factor, Pharm Dev Technol、13、541-547、2008、有

③石田厚、宮崎勝、外科手術における新しいテクニック-new art in surgery 末梢血単核球細胞移植と動脈再建のハイブリッド治療、臨床外科、63、585-593、2008、無

④石田厚、今牧瑞浦、志村仁史、新妻ゆり子、宮崎勝、2 種類の precuffed PTFE graft (Distaflo・Dynaflo) の同一人物使用症例における血管造影・Doppler color flow mapping による解析、脈管学、47、S194、2007、無

[学会発表] (計 2 件)

①石田厚、今牧瑞浦、宮崎勝、腹部大動脈-両側大腿動脈バイパス術後人工血管感染に対し、縫工筋充填術を併用し血行再建を施行した1例、第36回日本血管外科学会、2008年4月17日、東京

②石田厚、今牧瑞浦、志村仁史、新妻ゆり子、宮崎勝、2 種類の precuffed PTFE graft (Distaflo・Dynaflo) の同一人物使用症例における血管造影・Doppler color flow mapping による解析、第48回日本脈管学会総会、2007年10月26日、松本市

[図書] (計 0 件)

なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況 (計 0 件)

なし

[その他]

なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 厚 (ISHIDA ATSUSHI)  
東京慈恵会医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 70334183

(2) 研究分担者

森部 久仁一 (MORIBE KUNIHITO)  
千葉大学・大学院薬学研究院・准教授  
研究者番号: 50266350

(3) 連携研究者

宮崎 勝 (MIYAZAKI MASARU)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号: 70166156