

## ラット梗塞部心筋の副血行流量と 塩基性線維芽細胞増殖因子の関係

稲垣雅彦 石川欽司

近畿大学医学部第1内科学教室

### 抄 録

冠側副血行路は、冠動脈閉塞の際に心筋組織を壊死から防御する働きを果たすとされている。本実験では、強力な血管内皮細胞増殖作用をもつ塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor: bFGF) を投与したとき、ラット心筋梗塞後の梗塞部の副血行流量がどのように変化するかを明らかにする。Sprague-Dawley (SD) ラット62匹を用い、開胸下で左冠動脈を結紮して心筋梗塞を作成し、bFGF 10 µg を静注した7匹(C)、bFGF 100 µg を梗塞部心筋注入した16匹(D)、bFGF 100 µg を梗塞作成前に梗塞部 risk area に心筋注入した12匹(E)、対照群として生理食塩水(生食)を静注した12匹(A)、生食を梗塞部心筋注入した7匹(B)を作成した。この5群は4週間飼育した。bFGF 心筋注入群の1週飼育群8匹(F)も作成した。局所心筋血流量(Qm)はカラーマイクロスフェア法により測定し、bFGFのQmに及ぼす効果について検討した。摘出した心筋切片から梗塞サイズの計測、又、病理組織から梗塞部の生存心筋と線維化の程度を計測した。Qmは生食を用いた対照の2群では冠結紮直後6.5~9.8%と減少し、4週後には11.5~17.7%と増加した。種々の用法用量のbFGF群でも冠結紮直後Qmは8.1~19.1%と減少し、4週後には17.8~26.8%と増加した。しかし、それぞれの時点でのQmに有意差はなかった。梗塞サイズは冠結紮部位が高い程、梗塞サイズは大であった。しかしこの関係は対照とbFGF群間で差はなかった。梗塞巣の生存心筋の数及び心筋線維化の程度も両群間で差がなかった。イヌやブタで証明されているbFGF投与による梗塞部の冠血管新生作用や梗塞サイズ縮小効果はラットでは証明されず、bFGFの効果は種属や虚血の発生機序などに左右されると考えられた。

**Key words:** myocardial infarction, basic fibroblast growth factor, regional myocardial blood flow, angiogenesis

### 緒 言

虚血性心疾患に対する血管新生療法がここ数年脚光を浴びている<sup>1</sup>。冠動脈硬化などにより固有の循環経路が障害されているとき、薬剤により新生血管を増生させて副血行路を作り、血液循環を保とうとするものである。この目的には血管新生作用を有する成長因子(growth factor)<sup>2</sup>が検討されている。1992年 Yanagisawa-Miwa ら<sup>3</sup>はイヌを用いた心筋梗塞の実験で塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) の血管新生効果を発表した。彼女ら<sup>3</sup>はイヌの冠動脈左前下行枝(left anterior descending artery: LAD)を結紮して心筋梗塞を作成後、bFGF 10 µg を左回旋枝(left circumflex artery: LCX)に2度単回注入し、1週後に左室駆

出率と梗塞サイズを測定したところ、対照群と比べ有意な左室駆出率の増加と梗塞サイズの縮小を認めたと報告した。その機序として、新生血管の増加を解剖学的に証明している。しかし、新生血管を介する局所心筋血流量 (regional myocardial blood flow: Qm) の増加が機能的にどの程度の働きをしているか計測していない。又、イヌはそもそも副血行路の豊富な動物<sup>4</sup>で梗塞巣には副血行路が著明に発達するため、bFGF自身の効果を判定をする適当なモデルではないともいえる。本研究の目的は、副血行路の乏しいラット<sup>4</sup>を用いてQmを測定し、種々の用法用量によるbFGFの梗塞部のQmに及ぼす影響を明らかにすることである。

## 方 法

Sprague-Dawley (SD) ラット (週齢 $14.5 \pm 2.5$ : 平均±標準偏差, 体重 $422 \pm 47$  g) 62匹を用い, ジエチルエーテルにて吸入麻酔後ペントバルビタール30 mg/kgで腹腔内麻酔し, 頸部を切開して気管内挿管した。麻酔後60回/分の呼吸数, 3 mlの1回換気量の陽圧換気下に左第3肋間から開胸した。心臓を露出し, 左冠動脈を5-0絹糸にて左心房直下から心尖部の距離のほぼ中間の高さで結紮した。その後, 閉胸し, 4週間飼育した。bFGF心筋注入群では薬剤効果の時間的推移をみるため, 1週飼育群 (F群) も作成した。

Qm測定のために左心房へ非放射性カラーマイクロスフェア (E-Z trac 社 USA 製<sup>5</sup>) 20万個を注入した。マイクロスフェア注入のためには, これと等比重の13.3%のブドウ糖溶液を作成し, その0.2 mlにマイクロスフェア20万個を浮遊させた注入液を作成し, これを10秒間かけて左心房から注入した。冠結紮前には, 赤と緑のマイクロスフェアを注入, 結紮直後 (1分後) には橙と黒の2色を注入した。4週後 (F群では1週後) には初回と同様に麻酔開胸し, 青・黄・褐の3色のマイクロスフェアを注入した。対照群は冠結紮直後のマイクロスフェア注入後, 右頸静脈から24時間生理食塩水 (生食) を1 ml/hの定速で静注した12匹 (生食静注群: A), 生食を梗塞部左室壁内へ注入した7匹 (生食心筋注入群: B) の2群を作成した。4週後のマイクロスフェア注入時には総腸骨動脈を露出し, ポリエチレンチューブを挿入し, 動脈血を1.03 ml/minの定速で90秒間 (注入前30秒前から注入後60秒まで) 吸引し, Qmを絶対流量で測定するための reference bloodとした。

bFGF群は薬剤の効果と比較するため3群を作成

した。Human recombinant bFGF (科研製薬社製<sup>6-9</sup>) 10  $\mu$ gを24 mlの生食に溶解し冠結紮直後のマイクロスフェア注入後右頸静脈から1 ml/hの定速で24時間静注した8匹 (bFGF 10  $\mu$ g 静注群: C), 冠結紮直後のマイクロスフェア注入後にbFGF 100  $\mu$ gを生食0.04 mlに溶解し, これをハミルトン注射器を用いて全量梗塞部左室壁内へ注入した16匹 (D群), bFGF 100  $\mu$ gを梗塞作成前に梗塞部 risk areaに心筋注入した12匹 (E群), 合計36匹を作成した。このようにA~Fの6群を作成した。

A: 生食静注群 n=12

B: 生食心筋注入群 n=7

C: bFGF 10  $\mu$ g 静注群 n=7

D: bFGF 100  $\mu$ g 心筋注入群 n=16

E: bFGF 100  $\mu$ g 梗塞作成前心筋注入群 n=12

F: bFGF 100  $\mu$ g 心筋注入群 (1週飼育群) n=8

摘出心臓の処理方法と左室切片作成は以下のごとくである。

4週後 (A~E群) あるいは1週後 (F群) に青・黄・褐の非放射性カラーマイクロスフェアを注入した後, 過量のペントバルビタール静注下に心臓を摘出した。摘出心につき, 心尖部から心基部までの長さ (a), 心尖部から冠動脈を結紮した所までの長さ (b) を計測し, b/a (%) を結紮の高さ (ligated position) とした (図1)。摘出心はドライアイスにて冷凍後マイクロトーム内で1 mmの厚さ<sup>10</sup>で心基部から心尖部へ短軸連続切片を作成した。スライスした切片はその断面積を計測できるように写真に撮影した (図3)。

各切片につき, 肉眼的に梗塞部 (菲薄化が完全な部分: MI), 辺縁部 (梗塞が疑わしい部分から心筋壁厚が確実に正常となるまでの部分: BZ), 非梗塞部 (健常部) の3部分に分けた (図4)。この3部分の面積を求め, 全切片の合計から全左室の面積

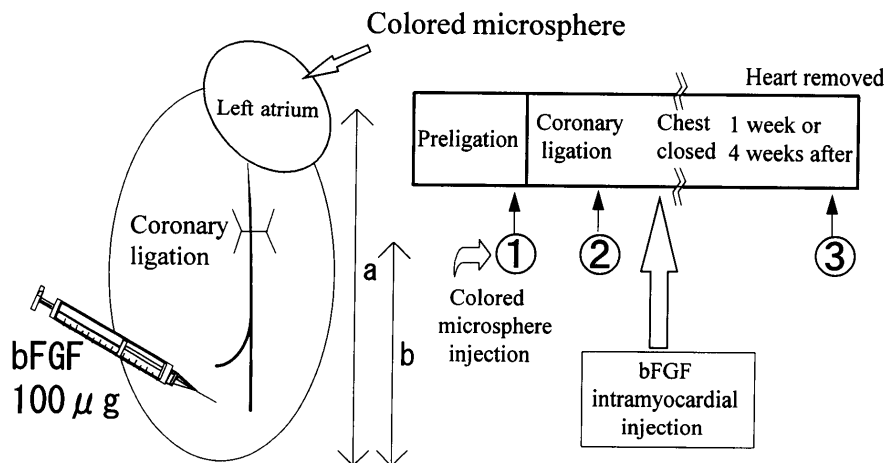


図1 実験プロトコール

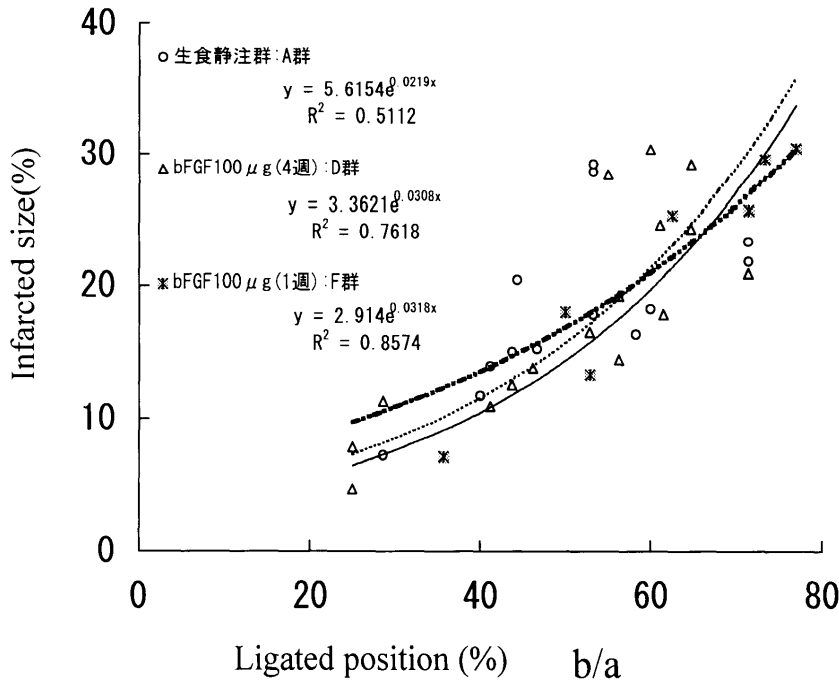


図2 冠動脈結紮部位と梗塞サイズとの関係

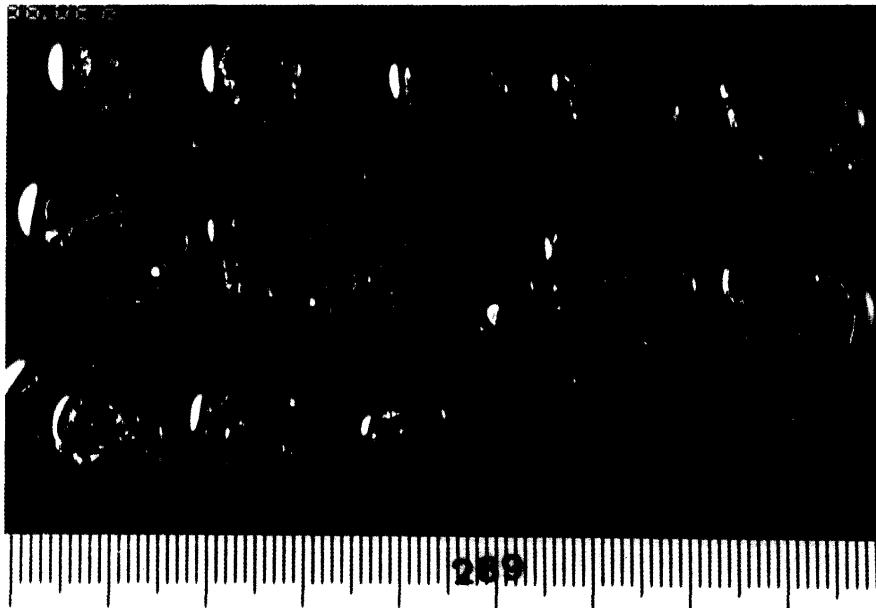


図3 摘出心全切片

(Total) に対する比でそれぞれ下式のように梗塞部サイズ (Infarct size)<sup>10</sup>, 辺縁部サイズ (Border zone) を算出した。

$$\text{Infarct size (\%)} = \frac{\sum \text{MI}}{\text{Total}} \times 100,$$

$$\text{Border zone (\%)} = \frac{\sum \text{BZ}}{\text{Total}} \times 100.$$

また梗塞部を含んだ切片のうちから、その中央部に当たる切片は病理組織提出用とした(図4)。その他の切片は前述のように梗塞部・辺縁部・健常部の3部分に分け、マイクロスフェア数カウント用とした<sup>5,11</sup>。

次に myocardium score と extent of fibrosis の測定法を記す。

梗塞部を含んだ中央の1切片は10%ホルマリンに約1ヶ月間固定し、アザン・マロリー染色した。この標本を200倍に拡大し写真撮影した。1枚の写真は0.38 mm×0.23 mmの広さであった。梗塞部はその中央部分と左右の辺縁部分につきそれぞれ心外膜側、壁中央部、心内膜側にわけそれぞれ5ヶ所合計15枚撮影した。梗塞部をはさむ左右両辺縁部ではそれぞれ同じく200倍で心外膜側、壁中央部、心内膜側

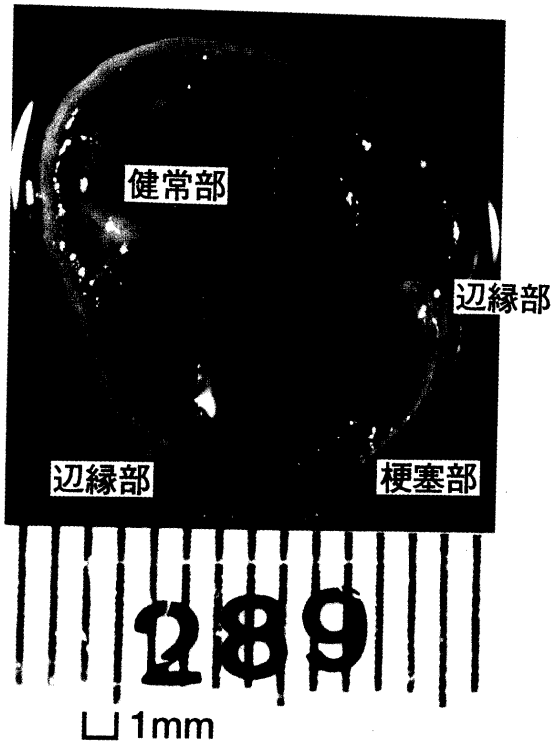


図4 梗塞部中央スライス切片

で2枚ずつ、合計12枚撮影した。非梗塞部は梗塞部と辺縁部を除いた部分とし、それぞれ心外膜側、壁中央部、心内膜側にわけ各2枚ずつ合計6枚撮影した。撮影した写真上に10×10の格子をあて point counting 法<sup>12</sup>により縦横の線が交わる100個所の部分で生きた心筋組織（横紋筋のある心筋）をカウントし、100のうち、生きた心筋の数を myocardium score とした（図5）。

同様にアザン・マロリー染色にて心筋線維化の程度をスコア化した。スコアは心筋線維化のないものを0、すべて線維化のものを+5とし、0から+5までの6段階評価を視覚的に分類し、この値を extent of fibrosis とした（図6）。Extent of fibrosis は3人の研究者が独立して判定し、その平均値をその写真の値とした。Myocardium score 及び extent of fibrosis は複数の写真により数値化されているがこれらを平均した1つの値をその検体の数値とした。

局所心筋血流量の測定法は既報<sup>5,11</sup>に詳述してある。簡単に述べると採取した心筋切片は秤量し、その後水酸化ナトリウム溶液 (2N NaOH) 中で30分間

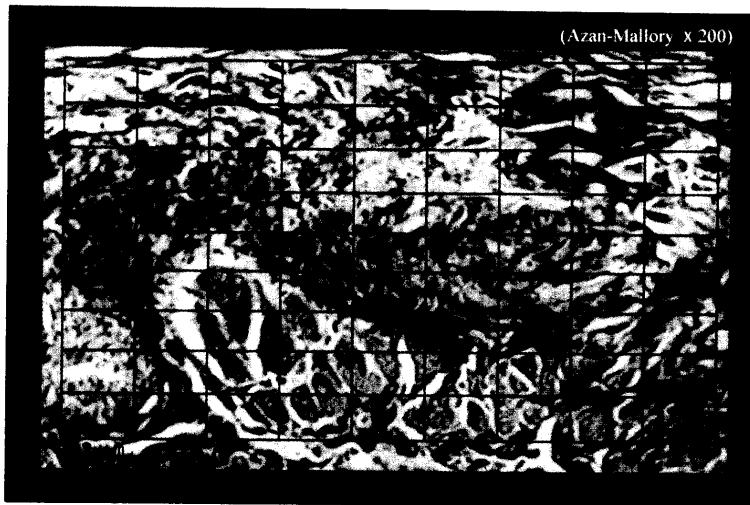


図5 Myocardium score 算出法（アザン・マロリー染色）（×200）

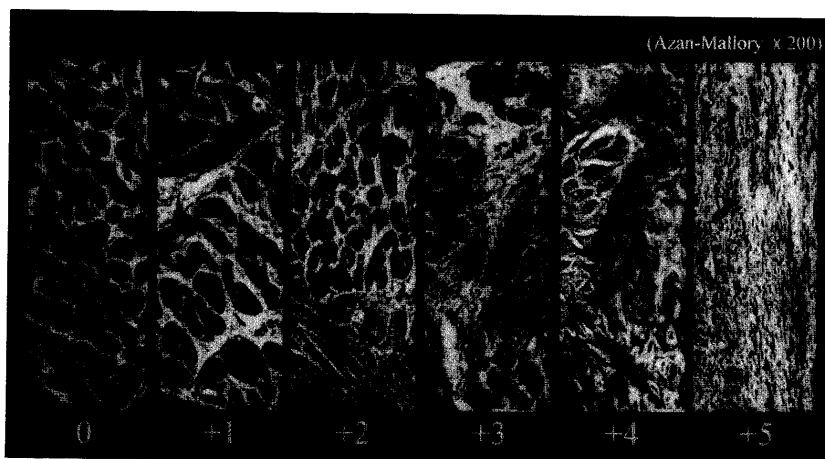


図6 Extent of fibrosis… 0～+5の代表的標本（アザン・マロリー染色）（×200）

煮沸, 溶解攪拌し, 先端に0.05 ml の目盛りを持つ10 ml の遠心用試験管に移した後, 遠心分離し, マイクロスフェアを回収した。回収されたマイクロスフェアは Fuchs-Rosenthal 血球算定盤にとり顕微鏡でその数を数え, 心筋 1 g 中のマイクロスフェア数を求めた。Qm は慢性期, reference blood を採取したものでは絶対流量 (ml/min/g) を下部の式を用いて算出した。

$$Qm = (Cm \times Qr) / Cr$$

但し, Qr は動脈血吸引速度 (1.16 ml/min), Cr は reference blood 中のマイクロスフェア数を示す。

冠結紮前及び冠結紮後急性期の Qm は microsphere loss<sup>13</sup> があるため絶対流量では算出できない。そこで Qm は冠結紮前の値を100として表示し, その値を非梗塞部のそれとの比 (% of noninfarcted) として下式で算出した。

$$Qm = (Q/Qc) \text{infarcted} / (Q/Qc) \text{noninfarcted} \times 100\%$$

但し, Qc は冠結紮前のコントロールの Qm, Q は求める時点の Qm を示す。

各計測値は, 平均±標準偏差 (standard deviation: SD) で表した。平均値の有意性は, 各数値に対応のある場合は paired t-test を, 対応のない場合は non paired t-test を行って, 平均値の差の有意性を検定した。

成 績

生食静注 (A) 群は50匹冠動脈を結紮し, 47匹は実験が成功し閉胸した。このうち35匹は死亡し, 4 週後の実験に供したものは12匹 (死亡率74%) であった。生食心筋注 (B) 群も24匹は閉胸し17匹は死亡し, 7 匹 (死亡率71%) が実験に供した。同様に, 閉胸後慢性期までに死亡したものは bFGF 10 µg 静注 (C) 群88%, bFGF 100 µg 心筋注入 (D) 群72%, bFGF 100 µg 結紮前心筋注入 (E) 群67%, bFGF 100 µg 心筋注入 1 週飼育 (F) 群62% であり, 6 群間で死亡率に差はなかった。

梗塞サイズは E 群16.6% から F 群20.9% と群間に僅かの差があったが, 生食注入の A, B に比べ bFGF の C~F いずれも有意差はなかった (表 1)。冠結紮の高さ (b/a) と梗塞サイズの関係は A, D, F 群の 3 群について図示した (図 2)。この図の如く, 両者間に比例関係があり, 結紮の高さが高い程, 梗塞サイズは大であった。しかし, この関係は対照群と bFGF 群間で差はなかった。辺縁部のサイズ (border zone) も各群間で差はなかった。

B, F 群でのみ reference blood 採取が成功し, 絶対流量 (ml/min/g) で Qm が計測できた。4 週後の

表 1 生食群, bFGF 群における体重, 心重量, 梗塞サイズ

急性期の週齢	体 重		心 重 量				摘出心スライス数	梗塞部サイズ (%)	辺縁部サイズ (%)	Ligated position b/a (%)
	急性期	4 週後 (慢性期)	全心重量	健全部	梗塞部	辺縁部				
(wk)	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)				
A. 生食静注群 (n=12)										
15.6	440	446	1.299	0.680	0.068	0.167	15.0	18.6	17.7	51.6
±1.2	±27	±48	±0.165	±0.121	±0.024	±0.066	±1.5	±6.5	±6.1	±12.8
B. 生食心筋注入群 (n=7)										
12.3	382	433**	1.502	0.509	0.062	0.216	15.0	19.9	25.7	52.8
±1.3	±36	±25	±0.165	±0.089	±0.026	±0.070	±1.0	±6.3	±7.6	±7.7
C. bFGF 10 µg 静注群 (n=7)										
12.6	401	429	1.312	0.705	0.083	0.145	15.0	19.2	17.0	48.6
±2.2	±40	±31	±0.084	±0.131	±0.038	±0.050	±1.1	±9.3	±5.0	±18.8
D. bFGF 100 µg 心筋注入群 (n=16)										
15.9	459	472	1.447	0.671	0.090	0.202	16.0	17.9	20.4	50.8
±1.0	±24	±20	±0.180	±0.131	±0.035	±0.101	±2.1	±7.8	±7.7	±14.6
E. bFGF 100 µg 梗塞作成前注入群 (n=12)										
11.8	365	403**	1.468	0.608	0.060	0.197	13.0	16.6	22.5	42.9
±0.6	±25	±33	±0.192	±0.117	±0.039	±0.062	±1.2	±8.0	±6.9	±19.4
F. bFGF 100 µg 心筋注入群 (1 週飼育群) (n=8)										
17.5	458	396**	1.325	0.475	0.111	0.143	15.0	20.9	16.9	59.1
±2.8	±32	±25	±0.196	±0.091	±0.047	±0.072	±1.4	±8.2	±8.7	±14.3

Difference between acute and chronic \*p<0.05 \*\*p<0.01

Mean±SD

表2 生食群, bFGF 群における局所心筋血流量 (Qm)

梗塞部		辺縁部		梗塞部	辺縁部	健常部
急性期	4週後 (慢性期)	急性期	4週後 (慢性期)	絶対流量 (慢性期)		
(% of noninfarcted)		(% of noninfarcted)		(ml/min/g)		
A. 生食静注群 (n=12)						
9.8	17.7	79.4	86.0			
±7.6	±13.2	±22.0	±24.8			
B. 生食心筋注入群 (n=7)						
6.5	11.5	63.4	64.1	1.37	4.71	5.23
±6.7	±8.6	±10.1	±14.6	±0.94	±2.45	±1.99
C. bFGF 10 µg 静注群 (n=7)						
14.0	22.4	91.5	96.5			
±6.0	±10.0	±22.8	±32.5			
D. bFGF 100 µg 心筋注入群 (n=16)						
17.5	18.3	77.9	81.0			
±14.7	±9.1	±19.2	±24.3			
E. bFGF 100 µg 梗塞作成前心筋注入群 (n=12)						
8.1	17.8	90.0	95.3	0.39	2.73	2.77
±7.6	±17.1	±45.9	±45.3	±0.24	±3.22	±2.55
F. bFGF 100 µg 心筋注入群 (1週飼育群) (n=8)						
19.1	26.8	80.9	87.9			
±10.6	±13.1	±25.6	±27.1			

Difference between acute and chronic \*p<0.05 \*\*p<0.01  
Mean±SD

表3 梗塞部, 辺縁部の生存心筋 (myocardium score) と心筋線維化の程度 (extent of fibrosis)

Myocardium score		Extent of fibrosis	
梗塞部 (%)	辺縁部 (%)	梗塞部	辺縁部
A. 生食静注群 (n=12)			
15.8	54.0	4.2	2.0
±6.2	±14.2	±0.3	±0.7
C. bFGF 10 µg 静注群 (n=8)			
12.3	66.9*	4.3	1.5
±9.1	±8.4	±0.5	±0.4
D. bFGF 100 µg 心筋注入群 (n=16)			
12.8	50.5	4.4*	2.2
±5.5	±18.2	±0.2	±0.9
E. bFGF 100 µg 梗塞作成前注入群 (n=12)			
6.2**	35.9*	4.8**	3.3**
±6.4	±21.1	±0.3	±1.1

Difference between saline iv group \*p<0.05 \*\*p<0.01  
Mean±SD

Qm (ml/min/g) は梗塞部で減少していたが, 梗塞部, 辺縁部, 健常部いずれの部位も B 群と F 群で有意差はみられなかった (表2)。

表2 に冠動脈結紮直後の Qm と梗塞作成 4 週後 (あるいは 1 週後) の Qm を示す。生食静注群 (A) では冠動脈結紮直後 Qm は 9.8±7.6% (% of noninfarct-

ed) と減少し, 4 週後には 17.7±13.2% へと増加した。種々の用法, 容量による bFGF を用いた他の 4 群 (C~F) でも表2 の如く冠動脈結紮直後, Qm は 8.1~19.1% と大幅に減少し, 4 週後にはいずれの群も 17.8~26.8% へと Qm は増加した。しかし生食群 (A・B) と bFGF 群 (C~F) ではどの組合せでもそれぞれの時点での Qm の値に有意差はなく, bFGF により, Qm が 1 週後あるいは 4 週後に生食群より増加することはなかった。

辺縁部の Qm は冠動脈結紮直後 (acute) 63.4~91.5% とわずかに減少した。慢性期 (chronic) には健常部の値に復帰する傾向があった。しかし梗塞部の Qm と同様に bFGF 群と生食群で有意差はなかった。

表3 では組織学的検討により, 梗塞巣内で生きた心筋の数 (myocardium score), 心筋線維化の程度 (extent of fibrosis) を比較した。Myocardium score は生食静注群 (A) では 15.8±6.2%, bFGF 10 µg 静注群 (C) では 12.3±9.1%, bFGF 100 µg 心筋注入群 (D) では 12.8±5.5% と差がなかったが, 梗塞作成前 bFGF 注入群 (E) で 6.2±6.4% と A 群より小さかった。Extent of fibrosis は bFGF 10 µg 静注の C 群で減少したが, bFGF 100 µg 結紮前心筋注入の E 群では逆に増加した。以上, 両指標について対照群と bFGF 群で統一した傾向はなかった。

## 考 察

bFGFの心筋梗塞サイズ縮小効果を初めて明らかにしたのは Yanagisawa-Miwa ら<sup>3</sup>である。彼女らはイヌの心筋梗塞作成後、bFGF 10 µgの冠動脈内注入2回投与を行い、1週後に左室駆出率と梗塞サイズを測定し、対照群と比べ有意な左室駆出率の増加と梗塞サイズの縮小を認めたと報告した。この結果はbFGFの血管新生作用により新生血管の増加をもたらしたためと彼女らは推測した。同様の実験を Sellke ら<sup>14</sup>はアメリロド装着のブタで、bFGFは calcium alginate microcapsule にしみ込ませ、これを冠動脈周辺に注入する方法を用いて血管新生作用を検討した。彼らの報告によると、梗塞部の arteriolar density は4倍に増加したという。Yanagisawa-Miwa らの続報<sup>15</sup>ではbFGF 30 µgとヘパリン 3 mgを心嚢内へ注入し、彼らの既報<sup>3</sup>とほぼ同様、血管数の増加、梗塞サイズ縮小、左室駆出率の保持を証明している。Boston大学のLandauら<sup>16</sup>はウサギでアンジオテンシンII負荷による心筋肥大を作り、bFGFを心嚢内に注入すると血管新生が増大するとしている。これらのすべての報告では局所心筋血流量が増大するか否か明らかにされていない。

EpsteinやUngerらを中心としたNIHグループはアメリロドを用いてイヌの冠動脈を徐々に狭窄し、酸性線維芽細胞増殖因子(acidic fibroblast growth factor: aFGF)<sup>17</sup>、bFGF<sup>18,19</sup>や血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)<sup>20</sup>を体内に埋め込んだ注入ポンプにより1ヶ月前後持続注入するモデルを用いて血管新生療法の効果を評価している。彼らの実験は血管新生の効果をみるため、薬剤投与により血管拡張を起こさせ、マイクロスフェアにより梗塞部の血流量を測定しているところに特徴がある。このモデルではaFGFではIZ/NZ(梗塞部の血流量の健常部に対する比率を薬剤投与前の比率で除した値: collateral flow index)は増加しないと報告している<sup>17</sup>。bFGF<sup>18</sup>では心拍数131から128 beats/min、血圧は150/90から138/95 mmHgと明らかな変化はないが梗塞部の血流量はbFGF投与2週後より増加し、4週後には梗塞部と健常部の血流比(IZ/NZ)は外層では対照群 $0.48 \pm 0.04$ 、bFGF群 $0.66 \pm 0.07$ 、内層ではそれぞれ $0.30 \pm 0.05$ 、 $0.47 \pm 0.09$ とbFGF群で血流が増加しているという。又、VEGFについてもほぼ同程度の効果を証明している<sup>20</sup>。

スペインのCuevas一派<sup>21</sup>はbFGFをしみ込ませたnitrocellulose paperをラット心表面に貼ると正

常心でありながら著しい血管新生がみられることを1995年のヨーロッパ心臓病学会で発表している。

イスラエルのBattlerら<sup>22</sup>はブタの急性心筋梗塞にbFGFを含有するウシ脳下垂体摘出液をしみ込ませたaffigel blue beadsを責任冠動脈へ注入した。2週後、組織学的には毛細血管数は著しく増加した。しかし、血行力学的評価のため、心エコーにて壁運動を測定したが、対照群との差を認めていない。この様にbFGFにより著明な反応がみられたとする報告がある一方、否定的な報告もある。

我々は非放射性カラーマイクロスフェア法<sup>5</sup>によりQmを測定することにより、bFGFの効果を明らかにしようと検討している。我々は初めbFGF投与法を10 µg末梢静脈注入(24時間)(C群)したが梗塞部Qmの増加はなかった<sup>23</sup>。そこで梗塞部risk areaの心筋内へ投与量を100 µgとし注入したが(D群)、梗塞部Qmの増加はみられなかった。更に、bFGFを梗塞作成前に注入した(E群)が何の効果も認められなかった。又、梗塞巣内の生存心筋の増加、線維化の減少、梗塞サイズの縮小という効果はこのラット実験ではC~Fいずれの群でも証明できなかった。

毛細血管の新生は永久に続くのではなく、必要がなくなれば消失するとも予想される<sup>19</sup>。Lazarousらの最近の報告<sup>19</sup>によると左房にbFGF 1日1.74 mg持続注入すると、血圧は約8%下降し、左室拡張末期圧やpeak dp/dtに有意な変化はないが、梗塞部の血流比(IZ/NZ)は注入開始1週後より増加し始めるという。注入2、3週後は血流比は大となっているが、4週後には対照群もこの値に達し、両群間で差がみられなくなるという(catch-up)。つまり、bFGFの血管新生促進作用は速やかに血管新生を促すものの、決して通常の血管新生以上に大量の副血行路を生むものでないとしている。本研究でも、このcatch-up現象によりQm増加が存在しないが如く計測されるのをおそれ1週間飼育の実験(F群)を追加した。しかし、QmはF群でも増加していなかった。

bFGFが毛細血管を増加させ、梗塞サイズを縮小させるとした報告が多いのに反し、本実験でこの現象がなかった理由として次のことが考えられる。種族間の差、即ちラットはイヌに比べ副血行路の乏しい動物である。Maxwellら<sup>4</sup>の実験によると冠動脈を結紮しても、イヌでは15.9%の血流が保たれるが、ラットでは僅か6.1%とされている。Native collateralの少ない動物ではbFGFの反応が乏しいことが予想される。

しかし、ラットよりnative collateralの乏しいブ

タでも bFGF の反応があるとの報告がある<sup>24</sup>。従って、native collateral の大小のみでは本実験結果は説明できない。但し、このブタ実験<sup>24</sup>は ameroid constrictor を用い、冠動脈を約 1 週間かけて徐々に結紮しているモデルである。Native collateral の乏しい動物でもその発達が間に合う様、徐々に冠動脈を結紮すれば bFGF の反応がえられる可能性がある。本研究では急速に冠結紮をしているので、この様な梗塞モデルに当てはまらないかも知れない。

スペインの Barrios ら<sup>21</sup>はラットで健常心の新生血管を報告しているが、この実験では bFGF としてウシ下垂体抽出液を用いており、本実験で用いた human recombinant bFGF とは異なっており、bFGF の相同性に問題が含まれるとも解釈される。

本実験では著明な新生血管増加作用を有する bFGF の反応は動物の種族によりかなりの差があり、又、虚血の発生機序が急速か、緩徐か、あるいは用いた bFGF の相同性の問題によっても効果が異なることが示された。アメリカでは bFGF の心筋梗塞への臨床応用が開始されている<sup>25</sup>。患者への応用を試みるに当たって、本実験ではその病態や用法用量により bFGF の効果が異なることを示し、使用方法に重要な警鐘を与えたものがある。従って、ラットにおいても 100 µg 以上の量をより効果的な注入方法を用いれば、血管新生の効果が出現することは否定できない。

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました小川 巖講師に深謝致します。また本研究を遂行するにあたりご協力を頂きました小菓裕成講師、木野博文博士、中井章至博士、ならびに第 1 内科学教室の各位に感謝の意を表します。

本論文の要旨およびその一部は第 36 回日本脈管学会総会(平成 7 年 11 月、沖縄)、第 37 回日本脈管学会総会(平成 8 年 10 月、京都)、第 12 回国際心臓研究会日本支部会(平成 7 年 12 月、大阪)、第 13 回国際心臓研究会日本支部会(平成 8 年 11 月、千葉)において発表した。また、本研究の一部は平成 6、7 年度文部省科学研究費補助金(一般研究 06670751)、平成 6、7 年度日本循環器学会計画研究によって行われた。

#### 文 献

- Engler DA (1996) Use of vascular endothelial growth factor for therapeutic angiogenesis. *Circulation* 94: 1496-1498
- Gospodarowicz D (1974) Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* 249: 123-128
- Yanagisawa-Miwa A, Uchida Y, Nakamura F, Tomaru T, Kido H, Kamijo T, Sugimoto T, Kaji K, Utsuyama M, Kurashima C, Ito H (1992) Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor. *Science* 257: 1401-1403
- Maxwell MP, Hearse DJ, Yellon DM (1987) Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischaemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 21: 737-746
- Hale SL, Alker KJ, Kloner RA (1988) Evaluation of nonradioactive, colored microspheres for measurement of regional myocardial blood flow in dogs. *Circulation* 78: 428-434
- 添田周吾, 大浦武彦, 塩谷信幸, 塚田貞夫 (1993) bFGF (KCB-1) の各種皮膚潰瘍に対する有用性の検討: 0.05% 溶液を用いた前期第 II 相試験. *臨床と研究* 70: 2660-2674
- 石橋康正, 新村真人, 西川武二, 中嶋 弘, 溝口昌子, 堀嘉昭, 古江増隆 (1993) 遺伝子組換えヒト型 bFGF (KCB-1) の各種皮膚潰瘍に対する臨床的有用性の検討. *臨床医薬* 9: 2553-2570
- 溝口昌子, 芹川宏二, 佐藤光浩, 日野治子, 堀江康治, 南光弘子, 池田美智子, 大原国章, 我妻圭子 (1993) 各種皮膚潰瘍に対する KCB-1 の臨床評価: 前期第 II 相臨床試験. *西日本皮膚科* 55: 1112-1120
- Kawaguchi H, Kurokawa T, Hanada K, Hiyama Y, Tamura M, Ogata E, Matsumoto T (1994) Stimulation of fracture repair by recombinant human basic fibroblast growth factor in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology* 135: 774-781
- Fletcher PJ, Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E (1981) Left ventricular diastolic pressure-volume relations in rats with healed myocardial infarction. *Circ Res* 49: 618-626
- Ishikawa K, Kamata N, Nakai S, Akiyama H, Koka H, Ogawa I, Katori R (1994) Preservation of high regional blood flow at epicardial rim after coronary occlusion in dogs. *Am J Physiol* 267: H528-H534
- Baandrup U, Olsen EGJ (1981) Critical analysis of endomyocardial biopsies from patients suspected of having cardiomyopathy. *Br Heart J* 45: 475-486
- Murdock RH Jr, Cobb FR (1980) Effects of infarcted myocardium on regional blood flow measurements to ischemic regions in canine heart. *Circ Res* 47: 701-709
- Sellke FW, Wang SY, Friedman M, Harada K, Edelman ER, Grossman W, Simons M (1994) Basic FGF enhances endothelium-dependent relaxation of the collateral-perfused coronary microcirculation. *Am J Physiol* 267: H1303-H1311
- Uchida Y, Yanagisawa-Miwa A, Nakamura F, Yamada K, Tomaru T, Kimura K, Morita T (1995) Angiogenic therapy of acute myocardial infarction by intrapericardial injection of basic fibroblast growth factor and heparin sulfate: an experimental study. *Am Heart J* 130: 1182-1188
- Landau C, Jacobs AK, Haudenschild CC (1995) Intrapericardial basic fibroblast growth factor induces myocardial angiogenesis in a rabbit model of chronic ischemia. *Am Heart J* 129: 924-931
- Unger EF, Banai S, Shou M, Jaklitsch M, Hodge E,



- Correa R, Jaye M, Epstein SE (1993) A model to assess interventions to improve collateral blood flow : continuous administration of agents into the left coronary artery in dogs. *Cardiovasc Res* 27 : 785-791
18. Unger EF, Banai S, Shou M, Lazarous DF, Jaklitsch MT, Scheinowitz M, Correa R, Klingbeil C, Epstein SE (1994) Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in a canine model. *Am J Physiol* 266 : H1588-H1595
19. Lazarous DF, Scheinowitz M, Shou M, Hodge E, Rajanayagam MAS, Hunsberger S, Robinson WG Jr, Stiber JA, Correa R, Epstein SE, Unger EF (1995) Effects of chronic systemic administration of basic fibroblast growth factor on collateral development in the canine heart. *Circulation* 91 : 145-153
20. Banai S, Jaklitsch MT, Shou M, Lazarous DF, Scheinowitz M, Biro S, Epstein SE, Unger EF (1994) Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation* 89 : 2183-2189
21. Barrios V, Cuevas B, Carceller F, Asin E, Jiménez JJ, Navarro J, Garcia-Segovia J, Moya JL, Minguez I, Cuevas P (1995) Angiogenesis in the rat heart induced by local delivery of basic fibroblast growth factor. *Eur Heart J* 16 (suppl) : 171 (abstr)
22. Battler A, Scheinowitz M, Bor A, Hasdai D, Vered Z, Di Segni E, Varda-Bloom N, Nass D, Engelberg S, Eldar M, Belkin M, Savion N (1993) Intracoronary injection of basic fibroblast growth factor enhances angiogenesis in infarcted swine myocardium. *J Am Coll Cardiol* 22 : 2001-2006
23. Inagaki M, Ishikawa K, Ogawa I, Koka H, Nakai S, Kino H, Kimura A, Miyataka M, Katori R (1996) Regional blood flow in infarcted myocardium of basic fibroblast growth factor-treated rats. *Acta Med Kinki Univ* 21 : 59-63
24. Harada K, Grossman W, Friedman M, Edelman ER, Prasad PV, Keighley CS, Manning WJ, Sellke FW, Simons M (1994) Basic fibroblast growth factor improves myocardial function in chronically ischemic porcine hearts. *J Clin Invest* 94 : 623-630
25. Quyyumi AA (1996) Treatment of myocardial ischemia : role of circadian rhythms and collaterals. presented at VIIth International Congress on Ambulatory Monitoring, May 8-10, Maihama, Japan