

塩基性線維芽細胞増殖因子の虚血心筋内投与による血管新生療法に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード: 作成者: 永峯, 洋 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9424

塩基性線維芽細胞増殖因子の虚血心筋内投与による 血管新生療法に関する研究

金沢大学医学部医学科外科学第一講座 (主任: 渡辺洋宇教授)

永 峯 洋

虚血性心疾患の冠側副血行形成過程において、細胞増殖因子による血管新生作用の関与が注目されている。冠側副血行が心筋虚血侵襲に対して防衛的役割を担うことは良く知られており、細胞増殖因子を用いた血管新生療法は、現在の虚血性心疾患に対する治療を補うものとして臨床応用が期待される。本研究ではイス冠状動脈結紮による急性心筋梗塞モデルを用いて、塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) を心筋内に直接投与し、その効果を局所心筋血流量、左心機能、左室形態、病理組織像より検討した。心筋梗塞モデルには雑種成犬15頭を用い対照群9頭、bFGF投与群6頭とした。左第4肋間小開胸下に左前下行枝を第一対角枝分岐直後で結紮し、bFGF 100 μ gを梗塞ならびに梗塞境界領域の心筋内に分散注入した。局所心筋血流量はカラーマイクロスフェア法を用いて、結紮前、直後、3日、1週、4週に測定し、左心機能は心エコー法にて評価した。また摘出心より壁菲薄化率 (梗塞部心筋壁厚/正常部心筋壁厚)、ならびに左心室拡大指数 (左室内周長-乳頭筋間距離/乳頭筋間距離) を計算し、梗塞後左室再構築の程度を定量化した。病理組織学検査として、血管内皮細胞のマーカーである von Willebrand 因子の免疫組織化学染色を行い、血管新生像を評価した。局所心筋血流量はbFGF投与で梗塞境界領域心内膜側、ならびに梗塞領域心外膜側において良好な増加を認めた。梗塞境界領域心内膜側では冠動脈結紮3日後 (bFGF群で74.5 \pm 5.2%, 対照群で40.8 \pm 6.7%, $p=0.007$) と1週間後 (bFGF群で71.5 \pm 9.0%, 対照群で38.8 \pm 5.4%, $p=0.012$) において、また、梗塞領域心外膜側では1週間後 (bFGF群で67.4 \pm 8.6%, 対照群で35.7 \pm 5.2%, $p=0.011$) において、bFGF群が対照群に比し有意に高い心筋血流量を示した。冠動脈結紮4週間後の病理組織学検査でも、bFGF群で梗塞境界領域を中心に毛細血管 (bFGF群で39.7 \pm 2.3個/200倍一視野, 対照群で22.7 \pm 1.1個/200倍一視野, $p=0.004$) ならびに細動脈 (bFGF群で4.50 \pm 0.43個/200倍一視野, 対照群で2.33 \pm 0.33個/200倍一視野, $p=0.012$) の増加を認めた。心機能検査では対照群で左室収縮末期容積の増加により左室駆出率が低下したが、bFGF群では冠動脈結紮1週間後に良好な左室駆出率を認めた (bFGF群で53.5 \pm 2.1%, 対照群で37.3 \pm 2.5%, $p=0.004$)。左室形態ではbFGF投与は梗塞心筋の壁菲薄化率を有意に抑制した (bFGF群で43.5 \pm 6.3%, 対照群で26.4 \pm 5.0%, $p=0.045$)。心筋内投与したbFGFは虚血心筋における血管新生を促進し、梗塞並びに梗塞境界領域の心筋血流を増加させ、梗塞後左室再構築過程で心室壁菲薄化と心室拡大を抑制し、心機能の改善に有効であった。

Key words basic fibroblast growth factor, collateral circulation, angiogenesis, myocardial blood flow, myocardial infarction, left ventricular remodeling

虚血性心疾患の治療において経皮的冠状動脈形成術が普及し、冠状動脈バイパス術 (coronary artery bypass grafting, CABG) は重症例にも行われるようになってきており、心筋保護法、体外循環法、手術手技等の進歩により比較的 safely に手術が施行され、また内胸動脈を代表とする動脈グラフトの使用により優れた遠隔成績が得られている¹⁾²⁾³⁾。しかし、冠状動脈の瀰漫性あるいは末梢狭窄病変を有する症例では、CABGによる完全血行再建が制限され、予後は不良である。一方、冠状動脈病変による心筋虚血に対して冠側副血行が防衛的役割を担うことは良く知られている。この側副血行の形成過程において、冠血流⁴⁾⁵⁾や冠状動脈内圧較差⁶⁾などの物理的要因が関与することが従来より提唱されてきたが、近年、各種の細胞増殖因子によ

る血管新生作用の関与が注目されている。Schaperグループは1982年、心筋虚血刺激により産生される細胞増殖因子が冠側副血行の発達に関与する可能性を示唆し⁷⁾、Kumarらは1983年、初めてヒトの心筋梗塞組織中に内皮細胞の増殖を促進する血管新生因子が存在することを報告した⁸⁾。その後、心筋組織中には高濃度の線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor, FGF) 類縁ペプチドが存在することがKardamら⁹⁾、Casscellsら¹⁰⁾により明らかにされ、現在では血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) とともに心臓由来の血管新生因子として側副血行形成に重要な役割を担っていると考えられている。

FGFは1974年 Gospodarowicz¹¹⁾により牛の下垂体から発見さ

平成11年1月24日受付, 平成11年4月5日受理

Abbreviations: bFGF, basic fibroblast growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; CABG, coronary artery bypass grafting

れた線維芽細胞に強い増殖促進活性をもつ蛋白で、現在ではFGFファミリーとしてアミノ酸配列に相同性を有する10の因子が同定されている。なかでもヒト塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)は154個のアミノ酸からなる分子量17,000の一本鎖ポリペプチドで、FGFのプロトタイプとしてヒトの全身の様々な臓器に広く分布している。bFGFの生理活性作用は多くの細胞に及び、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、繊維芽細胞、筋芽細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、グリア細胞などの中胚葉系、神経外胚葉系の細胞の増殖を促進する。bFGFはその血管新生作用において、血管基底膜の分解、血管内皮細胞の遊走、内皮細胞の増殖、管腔形成の4つの段階のすべてを促進し、また平滑筋細胞の増殖促進によって毛細血管を細動脈まで成長させ、側副血行形成に大きく関与する¹²⁾。

1992年、Yanagisawa-Miwaら¹³⁾はイヌの急性心筋梗塞の実験モデルで、bFGFの冠状動脈内投与によって毛細血管や細動脈の数が増加し、心筋梗塞量が縮小し、心機能が改善したと報告した。しかし、急性心筋梗塞におけるbFGFの効果発現の機序は解明されていない。また、bFGFの心筋内投与は冠状動脈内投与と異なり、冠状動脈病変や形態にかかわらず広く応用される可能性があるが、その効果は判明していない。

本研究では、bFGFの心筋内投与による急性心筋梗塞に対する新しい治療法の可能性を評価するために、イヌ冠状動脈結紮による急性心筋梗塞モデルを用いてbFGFを虚血心筋内に直接投与し、局所心筋血流量と左心機能の経時的変化、左室形態、並びに病理組織像より、虚血心筋における血管新生と血流回復、さらに梗塞後左室再構築に及ぼす影響について検討した。

材料及び方法

I. 実験動物

実験動物として体重11～16kgの雑種成熟イヌ15頭を用いた。実験動物の使用は金沢大学宝町地区動物実験指針に従った。実験群は急性心筋梗塞モデルにbFGFを心筋内局所投与したbFGF群(6頭)と、生理食塩水を心筋内局所投与した対照群(9頭)とした。

II. 実験モデルの作成

塩酸ケタミン(三共、東京)20mg/kgを筋肉内に投与した後、ベントバルビタールナトリウム(田辺製薬、大阪)30mg/kg及びバンクロニウムクロプロマイド(日本オルガノン、東京)0.1mg/kgを静脈内に投与し、気管内挿管下にHarvard型従量式人工呼吸器(Bodine Electric, Chicago, USA)を用い、純酸素による調節呼吸を行った。四肢誘導心電図をモニターし、右大腿動脈よりカテーテルを挿入し動脈圧をモニターした。心エコーにより術前左心機能を測定した後、手術を開始した。約5cmの左第4肋間小開胸下に心臓を露出し、左心耳より心内圧測定ならびにマイクロスフェア注入用のカテーテルを刺入し左房内に留置した。次いで、左冠状動脈前下行枝を第一対角枝分岐直後で結紮し、急性心筋梗塞モデルを作成した。bFGF及び生理食塩水の心筋内局所投与は冠状動脈結紮直後に行った。不整脈は2%塩酸リドカイン1mg/kg(藤沢、東京)を静脈内投与することによって予防し、血行動態が安定した後、開胸創を縫合閉鎖し手術を終了した。左房内カテーテルは皮下を通して背部に固定し、カテーテル内腔には血栓閉塞防止のためにヘパリンを注入した。

III. bFGFの構造と投与方法

bFGFとしてKCB-1(科研製薬、東京)を使用した。KCB-1は米国Scios Nova社が生産したアミノ酸154個からなる分子量が約17kDaの遺伝子組み換えヒトbFGFを含有する製剤であり(図1)、原体を輸入して試験製剤として製造されたものである。

KCB-1 100 μ gを1.6mlの生理食塩水に溶解し、冠状動脈結紮直後に、虚血領域を中心として左室自由壁心筋に広範囲に12.5 μ g(0.2ml)を8カ所、合計100 μ gを局所投与した。心筋内へのbFGFの投与は26Gの皮内用注射針(テルモ、東京)を用いて心外膜側より5mmの深さに行った(図2)。対照群では生理食塩水(0.2ml)を8カ所、同様に心筋内局所投与した。

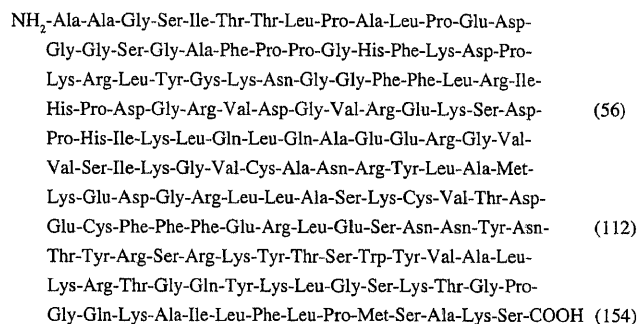


Fig. 1. Amino acid sequence of human bFGF. Human bFGF is a single-chain polypeptide of 154 amino acids with a molecular size of 17-kD.

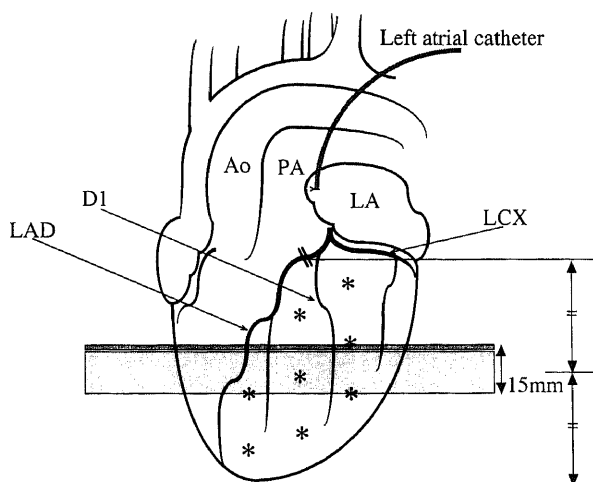


Fig. 2. Schema of the experimental design. Acute myocardial infarction was made by ligation of the left anterior descending coronary artery (LAD) distal to its first diagonal branch. bFGF (100 μ g) was injected at 8 sites of ischemic area of the left ventricular wall between the LAD and left circumflex coronary artery (LCX) (the sites of injection are shown by *). The left atrial catheter was served for administration of colored microspheres. After 4 weeks the heart was excised and a central short-axis slice of 15mm thick was cut from the left ventricle. The left ventricular portion of the central slice was used for analyses of microsphere blood flow, and for the study of ventricular morphology and myocardial histology. Ao, aorta; PA, pulmonary artery; LA, left atrium; D1, first diagonal branch; ■, slice for analyses of microsphere blood flow measurement; ■, slice for morphological and histological study.

IV. 測定項目と測定方法

1. 局所心筋血流量

局所心筋血流量の測定には非放射性カラードマイクロスフェア (E-Z Trac, Los Angeles, USA) を用いた。このマイクロスフェアは放射線の代わりに特殊染料により標識されたポリスチレン/ジビニルベンゼン架橋結合体製の直径 $15\mu\text{m}$ 、比重1.050の微小球である。左心房に注入すると、赤血球と同様に血流に従って全身に分散し、最終的に各臓器の微小血管系に留まる。マイクロスフェアは、強酸・強塩基溶液を含め液体中で浸出することがなく、生体から抽出後に顕微鏡で明確に識別することが可能である。従来の放射性マイクロスフェア法と比較して安全かつ低コストで局所血流量を測定できる利点があり、イスを用いた冠状動脈閉塞後の局所血流量測定では放射性マイクロスフェア法と $r=0.98$ という相関関係を示した¹⁴⁾。マイクロスフェアの注入は冠状動脈結紮前、直後、3日後、1週間後、2週間後、4週間後に左房内留置カテーテルより行い、6色のそれぞれ異なる色のマイクロスフェアを一回につき600万個注入した。マイクロスフェア注入と同時に局所血流量算出のための基準血液サンプルを大腿動脈より血液吸引ポンプを用いて一定速度 (7.5ml/分) で2分間採取した。

手術から4週間後心臓を摘出し、冠状動脈結紮部の高さから心尖部までの距離を二等分するレベルで左心室長軸に垂直に輪状に切断し、厚さ15mmの心筋層を切除した (図2)。これを放射状に8等分し、さらに心内膜側と心外膜側に2分し、合計16のセグメントに分割した (図3)。分割はセグメント5に左前下行枝が含まれるように行い、セグメント5を梗塞領域、その周囲のセグメント4, 6を梗塞境界領域とし、セグメント1, 2は右冠動脈領域、セグメント7, 8は左回旋枝領域とした。

マイクロスフェア抽出は専用の抽出試薬キット (E-Z Trac, Los Angeles, USA) を用いて行った。各セグメントの心筋重量を測定した後、加熱した2N水酸化ナトリウム溶液で組織を融解し、遠心してマイクロスフェアのみを分離抽出した。マイクロスフェア数は赤血球算定盤を用いて顕微鏡で計測し、局所心筋血流量 (Qm) を以下の式で算出した。

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

ただし、Qm: 局所心筋血流量 (ml/min/g)

Cm: 組織1g当たりのマイクロスフェア数

Cr: 左房注入時に同時に吸引した動脈血中に含まれるマイクロスフェア数

Qr: 動脈血吸引速度 (ml/min)

すべてのセグメントの局所心筋血流量を絶対値で算出した後、各セグメントについて、冠状動脈結紮前値を基準とした%に換算した。さらに各測定時点で、セグメント1, 2, 7, 8の非梗塞領域の平均値を健康部心筋血流量とし、その値を基準にして再度%に換算し、局所血流量変動の指標とした。局所血流量の検討は梗塞領域 (セグメント5) と、梗塞境界領域 (セグメント4, 6) について行った。

2. 心機能

心機能は経胸壁心エコー法にて冠状動脈結紮前、結紮3日後、1週間後、2週間後、4週間後に測定した。測定は塩酸ケタミン20mg/kgを筋肉内投与した後の安静時に行った。超音波診断装置SSS-118F (フクダ電子, 東京) を使用し、3.5MHzの探

触子を用いた。エコー像はビデオテープに記録し、心尖部四腔断面像より単一断面、面積-距離法にて左室拡張末期容積、左室収縮末期容積、左室駆出率を計算した。左室拡張末期容積、左室収縮末期容積に関しては冠動脈結紮前値を基準とした%に換算した。

3. 心筋逸脱酵素の測定

冠状動脈結紮による虚血心筋障害の指標として、冠状動脈結紮前、結紮24時間後に血清トロポニンT (ng/ml) を測定した。トロポニンTはモノクローナル抗体を用いた免疫酵素抗体法により測定した。

4. 形態学的ならびに病理組織学的評価

摘出心は輪状に切断し、肉眼所見より貫壁性梗塞、心内膜下梗塞の2つに分類した。また、乳頭筋レベルで後壁心筋壁厚 (正常部)、前壁心筋壁厚 (梗塞部)、左室内周長、乳頭筋間距離を測定し、Jugduttら¹⁵⁾の方法 (図4) を用い、以下の式で壁菲

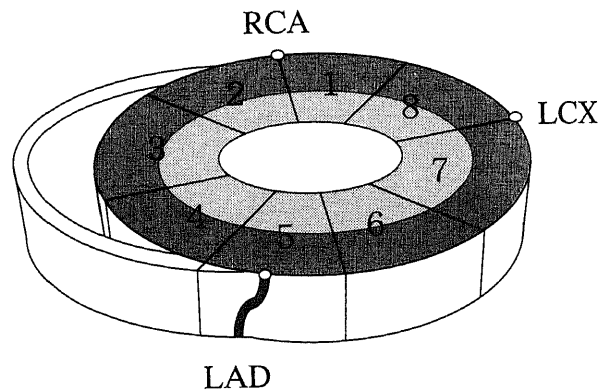


Fig. 3. The heart was cut into short-axis slices of 15 mm thick. The left ventricular portion of the central slice was divided into 8 circumferential segments and each was further subdivided into endocardial and epicardial portions. These 16 segments were used for microsphere blood flow measurement. LAD, left anterior descending coronary artery; LCX, left circumflex coronary artery; RCA, right coronary artery.

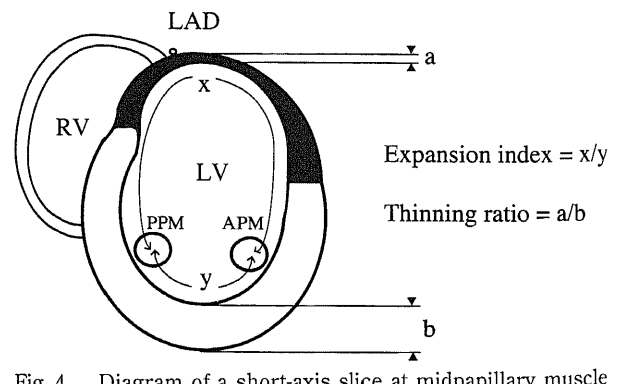


Fig. 4. Diagram of a short-axis slice at midpapillary muscle level indicating method of expressing infarct expansion and ratio of thinning of infarcted to non-infarcted area. x, endocardial length of infarction-containing segment; y, endocardial length of segment without infarction; a, average thickness of infarcted area; b, average thickness of non-infarcted area; LV, left ventricle; RV, right ventricle; APM, anterior papillary muscle; PPM, posterior papillary muscle; LAD, left anterior descending coronary artery.

薄化率と左室拡大指数を測定した。

壁菲薄化率 = 前壁心筋壁厚 / 下壁心筋壁厚

左室拡大指数 = (左室内周長 - 乳頭筋間距離) / 乳頭筋間距離

次に摘出心は各セグメントに分割し、マイクロスフェア一局所血流量測定用の心筋サンプルを取り出した後、10%中性ホルマリン液にて固定した。標本はパラフィン包埋後薄切し、HE染色とマッソン・トリクローム染色を行った。また血管内皮細胞のマーカーである von Willebrand 因子の免疫組織化学染色をアビチン・ビオチン化ペルオキシダーゼ複合法にて行った。

梗塞境界領域における血管新生像を顕微鏡にて観察し、200倍(10倍接眼レンズ, 20倍対物レンズ)で一視野(0.442mm²)当たりの毛細血管ならびに細動脈数を計測した。Uchidaら¹⁰の方法に準じて、直径25μm未満を毛細血管、直径25μm以上100μm未満を細動脈として検討した。

IV. 統計学的検定法

測定値は、すべて $\bar{x} \pm \text{SEM}$ で表示した。両群間の心機能ならびに心筋局所血流量の経時的変化に関する有意差検定には、反復測定のある分散分析法(repeated-measures analysis of variance)を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。有意差のあったものについては更にBonferroni検定を行い任意の時点での比較をした。両群間のトロポニンT値、左室形態、血管数の差の検定にはMann-WhitneyのU検定を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

成 績

対照群9頭のうち3頭は冠状動脈結紮後1週以内に死亡し、2頭は2週以内に死亡し、4頭は4週間生存した。bFGF群6頭は

全例4週間生存した。以後の成績の検討は1週以上生存した12頭について行った。

I. 局所心筋血流量

1. 梗塞領域

1) 心内膜側

梗塞領域の心内膜側における局所心筋血流量は冠状動脈結紮直後に両群とも同様に有意に低下し、対照群で $16.9 \pm 3.6\%$ 、bFGF群で $20.8 \pm 5.7\%$ となった。その後、対照群は緩やかに増加し4週間後に $28.7 \pm 1.6\%$ であったのに対し、bFGF群は1週間後で $35.8 \pm 8.3\%$ となり、4週間後は $35.7 \pm 7.7\%$ であった。3日後以降の局所血流量の増加はbFGF群で良好な傾向があったが、局所心筋血流量の経時変化については2群間で統計学的に有意差を認めなかった(図5A)。

2) 心外膜側

梗塞領域の心外膜側における局所心筋血流量は冠状動脈結紮直後は両群とも同様に有意に低下し、対照群で $32.0 \pm 4.4\%$ 、bFGF群で $36.2 \pm 7.3\%$ であった。その後、対照群は1週間後まで $35.7 \pm 5.2\%$ であったが、2週間後に $46.7 \pm 6.1\%$ となり、4週間後には $56.3 \pm 5.7\%$ まで回復した。これに対して、bFGF群は3日後に $59.2 \pm 10.2\%$ で、1週間後は $67.4 \pm 8.6\%$ に増加し、4週間後にはさらに $83.1 \pm 14.1\%$ まで回復した。局所心筋血流量の経時変化は対照群とbFGF群で有意差($p = 0.029$)を認め、1週間後($p = 0.011$)の時点でbFGF群の局所血流量は対照群より有意に高値であった(図5B)。

2. 左室側壁梗塞境界領域

1) 心内膜側

左室側壁の梗塞境界領域の心内膜側における局所心筋血流量

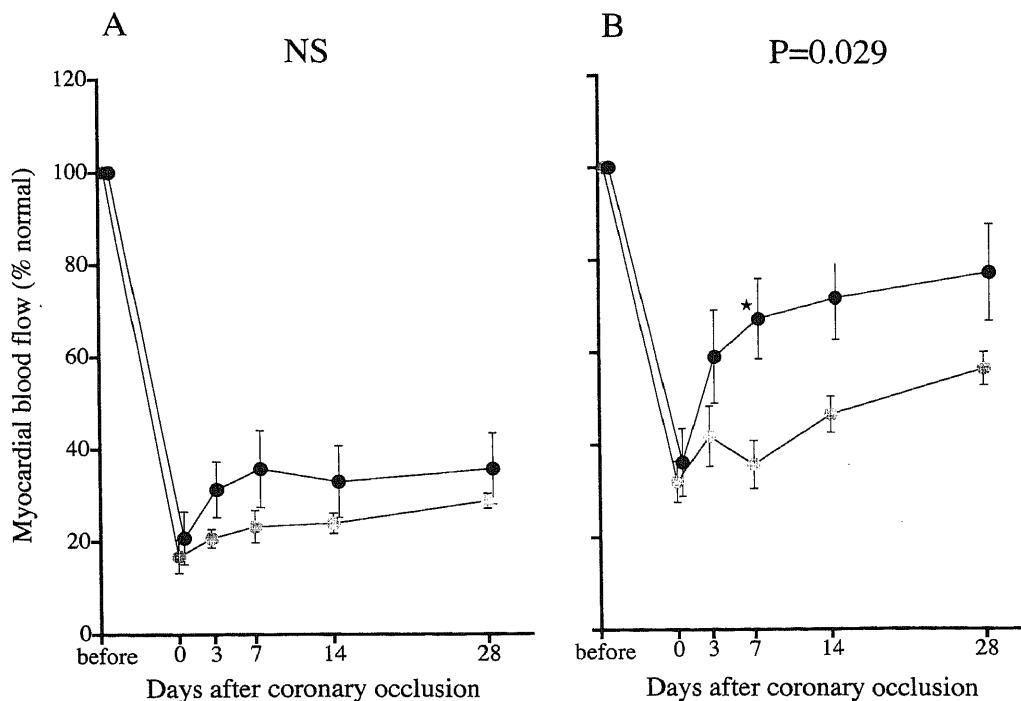


Fig. 5. Effects of bFGF treatment on regional myocardial blood flow in segment 5 after coronary occlusion. ●, bFGF-treated group; ○, control group. Each value represents $\bar{x} \pm \text{SEM}$. (A) Myocardial blood flow in endocardial portion. NS, no significant difference between bFGF-treated and control groups by repeated-measure analyses of variance. (B) Myocardial blood flow in epicardial portion. $P=0.030$, significant difference between bFGF-treated and control groups by repeated-measure analyses of variance. ★, $P < 0.05/4$ or 0.0125 bFGF versus control group after Bonferroni's correction

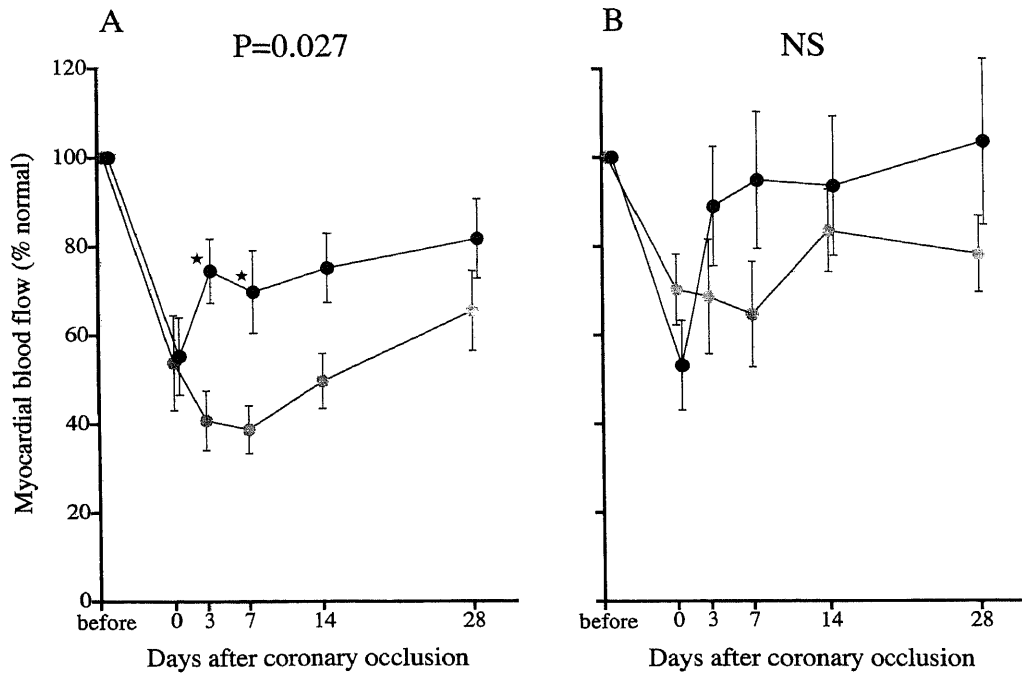


Fig. 6. Effects of bFGF treatment on regional myocardial blood flow in segment 6 after coronary occlusion. ●, bFGF-treated group; ○, control group. Each value represents $\bar{x} \pm \text{SEM}$. (A) Myocardial blood flow in endocardial portion. $P=0.027$, significant difference between bFGF-treated and control groups by repeated-measure analyses of variance. ★, $P<0.05/4$ or 0.0125 bFGF versus control group after Bonferroni's correction. (B) Myocardial blood flow in epicardial portion. NS, no significant difference between bFGF-treated and control groups by repeated-measure analyses of variance.

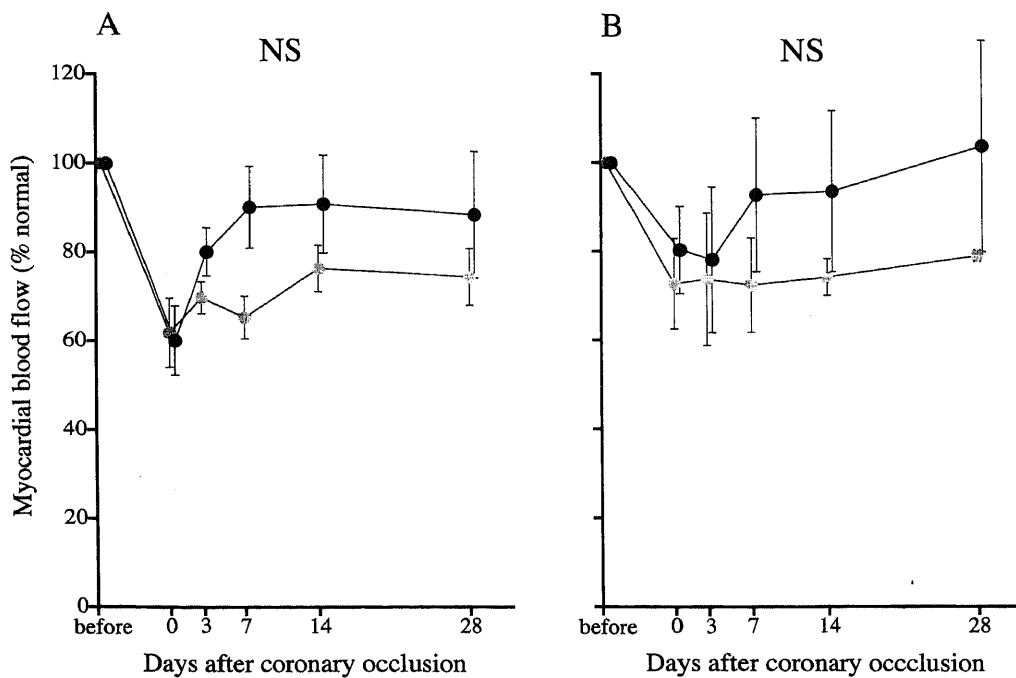


Fig. 7. Effects of bFGF treatment on regional myocardial blood flow in segment 4 after coronary occlusion. ●, bFGF-treated group; ○, control group. Each value represents $\bar{x} \pm \text{SEM}$. (A) Myocardial blood flow in endocardial portion. (B) Myocardial blood flow in epicardial portion. NS, no significant difference between bFGF treated and control groups by repeated-measure analyses of variance.

は冠動脈結紮直後は両群とも同様に低下し、対照群で $53.8 \pm 10.7\%$ 、bFGF群で $55.3 \pm 8.7\%$ であった。対照群ではその後も更に低下し、3日後に $40.8 \pm 6.7\%$ 、1週間後に $38.8 \pm 5.4\%$ となった。これに対してbFGF群は3日後に $74.5 \pm 7.2\%$ となり、1週間後は $71.5 \pm 9.0\%$ 、4週間後には $81.7 \pm 8.9\%$ まで増加した。局所心筋血流量の経時的変化は対照群とbFGF群で有意差 ($p = 0.027$) を認め、3日後 ($p = 0.007$)、1週間後 ($p = 0.012$) の時点でbFGF群の局所心筋血流量は対照群より有意に高値であった (図6A)。

2) 心外膜側

左室側壁の梗塞境界領域の心外膜側における局所心筋血流量は対照群では冠動脈結紮直後に $70.3 \pm 8.0\%$ に低下したが、その後有意な変化はなく4週間後は $78.3 \pm 8.6\%$ であった。これに対してbFGF群は冠動脈結紮直後 $53.2 \pm 10.1\%$ であったが、3日後に $89.0 \pm 13.4\%$ となり、さらに4週間後に $103.6 \pm 18.7\%$ まで回復した。しかし、局所心筋血流量の経時的変化については2群間で統計学的に有意差を認めなかった (図6B)。

3. 中隔梗塞境界領域

1) 左室側

中隔の梗塞境界領域の左室側における局所心筋血流量は、対照群では冠動脈結紮直後 $61.8 \pm 7.8\%$ に低下し、1週間後に $65.2 \pm 4.8\%$ 、4週間後でも $74.3 \pm 6.4\%$ であった。これに対してbFGF群は冠動脈結紮直後 $59.7 \pm 7.8\%$ に低下した後、1週間後には $90.0 \pm 9.2\%$ まで増加し、4週間後は $88.3 \pm 14.2\%$ であった。3日後以降の局所血流量の増加はbFGF群で高い傾向があったが、局所心筋血流量の経時的変化については2群間で統計学的に有意差を認めなかった (図7A)。

2) 右室側

中隔の梗塞境界領域の右室側における局所心筋血流量は対照群で冠動脈結紮直後 $72.7 \pm 10.2\%$ に低下した後、ほとんど変

化がなく4週間後も $79.0 \pm 1.3\%$ であった。これに対してbFGF群は冠動脈結紮直後 $80.3 \pm 9.8\%$ であり、1週間後は $92.7 \pm 17.3\%$ 、4週間後は $103.7 \pm 23.8\%$ で増加傾向にあった。しかし局所心筋血流量の経時的変化については2群間で統計学的に有意差を認めなかった (図7B)。

II. 心機能

1. 左室収縮末期容積

左室収縮末期容積は冠動脈結紮3日後は両群とも増加し、対照群 $186.4 \pm 18.1\%$ 、bFGF群 $208.2 \pm 53.0\%$ であった。対照群で1週間後は $200.2 \pm 9.5\%$ と変化を認めず、2週間後 $148.5 \pm 11.4\%$ まで減少したが、4週間後 $179.0 \pm 15.5\%$ と再び増加傾向にあった。これに対し、bFGF群は1週間後に $155.8 \pm 19.7\%$ と低下し、以降はほとんど変化せず4週間後にも $149.3 \pm 8.1\%$ であった。左室収縮末期容積の経時的変化については2群間で統計学的に有意差を認めなかった (図8A)。

2. 左室拡張末期容積

左室拡張末期容積は冠動脈結紮3日後に対照群で $125.8 \pm 7.4\%$ 、bFGF群で $128.2 \pm 20.9\%$ であった。2週間後は対照群 $111.5 \pm 8.4\%$ 、bFGF群 $111.8 \pm 6.8\%$ となったが、4週間後では対照群が $136.0 \pm 16.3\%$ と再び増加傾向にあった。左室拡張末期容積の経時的変化は2群間で統計学的に有意差を認めなかった (図8B)。

3. 左室駆出率

冠動脈結紮前の左室駆出率は対照群で $62.2 \pm 2.7\%$ 、bFGF群で $63.2 \pm 2.2\%$ であった。結紮3日後は両群ともほぼ同様に低下し、対照群で $42.2 \pm 2.9\%$ 、bFGF群で $44.3 \pm 5.0\%$ であった。対照群では1週間後に $37.3 \pm 2.5\%$ となり、2週間後に $48.3 \pm 1.9\%$ に上昇したが、それ以上の回復は認めず4週間後 $48.0 \pm 2.6\%$ に留まった。これに対し、bFGF群は1週間後に

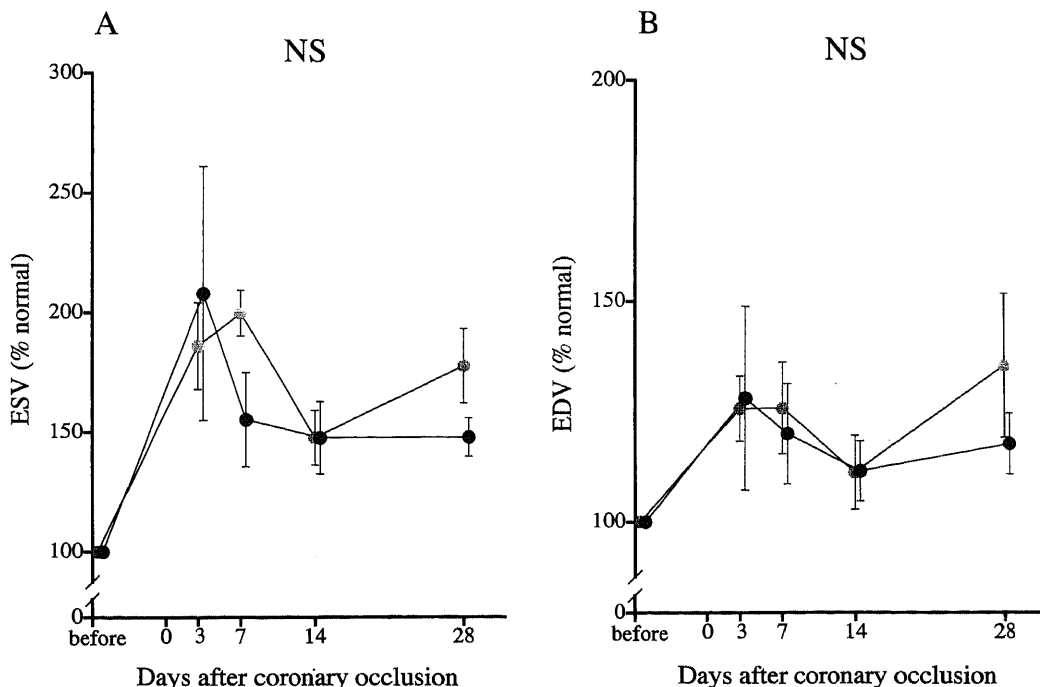


Fig. 8. (A) Effects of bFGF treatment on left ventricular endosystolic volume after coronary occlusion. (B) Effects of bFGF treatment on left ventricular endodiastolic volume before and after coronary occlusion. ●, bFGF-treated group; ○, control group. Each value represents $\bar{x} \pm \text{SEM}$. NS, no significant difference between bFGF-treated and control groups by repeated-measure analyses of variance.

53.5 ± 2.1%にまで改善したが、以降もほぼ同様な値で、4週間後にも54.0 ± 2.1%であった。左室駆出率の経時変化については2群間で有意差 (p = 0.017) を認め、1週間後の時点でbFGF群が対照群に比べて有意に良好であった (p = 0.004)。2週間後、4週間後ではbFGF群が良好な傾向があった (図9)。

Ⅲ. 心筋逸脱酵素

トロポニンT値は術前に対照群で0.16 ± 0.05ng/ml, bFGF群で0.12 ± 0.02ng/mlであり、両群間に有意差はなかった。術後24時間後は対照群で7.25 ± 1.44 IU/L, bFGF群で8.01 ± 1.75 IU/Lと上昇したが、2群間で統計学的に有意差は認めなかった。

Ⅳ. 形態学的ならびに病理組織学的評価

1. 形態学的評価

1) 梗塞の性状

対照群は貫壁性梗塞が5例、心内膜下梗塞が1例であり、bFGF群は貫壁性梗塞が3例、心内膜下梗塞が3例であった。両群を含めて心筋梗塞組織が心室中隔に及んだ例は対照群の1例のみで、他は左室自由壁の梗塞であった。

2) 壁菲薄化率および左室拡大指数

壁菲薄化率は対照群で26.4 ± 5.0%, bFGF群で43.5 ± 6.3%であり、対照群で有意に壁の菲薄化を認めた (p = 0.045) (図10A)。左室拡大指数は対照群で2.2 ± 0.11%, bFGF群で2.3 ± 0.07%であり、2群間で統計学的に有意な差は認めなかった (図10B)。

2. 血管新生

梗塞境界領域における毛細血管数は対照群で22.7 ± 1.1個/一視野, bFGF群で39.7 ± 2.3個/一視野であり、bFGF群で有意

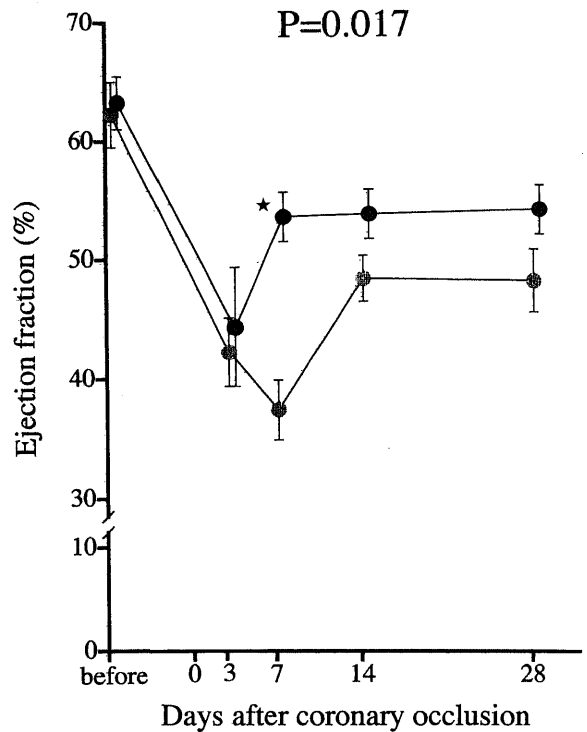


Fig. 9. Effects of bFGF treatment on left ventricular ejection fraction after coronary occlusion. ●, bFGF-treated group; ○, control group. Each value represents $\bar{x} \pm \text{SEM}$. P=0.027, significant difference between bFGF-treated and control groups by repeated-measure analyses of variance. ★, P<0.05/4 or 0.0125 bFGF versus control group after Bonferroni's correction.

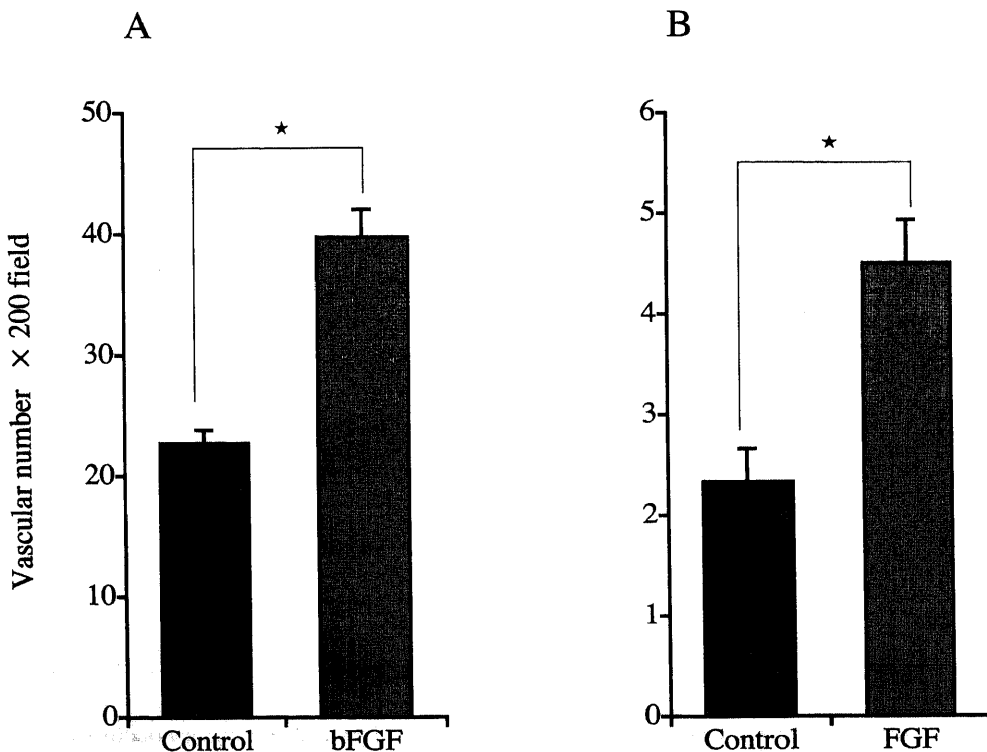


Fig. 10. Effects of bFGF treatment on left ventricular morphology. (A) thinning ratio. (B) expansion index. Each value represents $\bar{x} \pm \text{SEM}$. Black column, the control group; Shaded column, the bFGF-treated group. ★, P<0.05 versus control group by Mann-Whitney's U test.

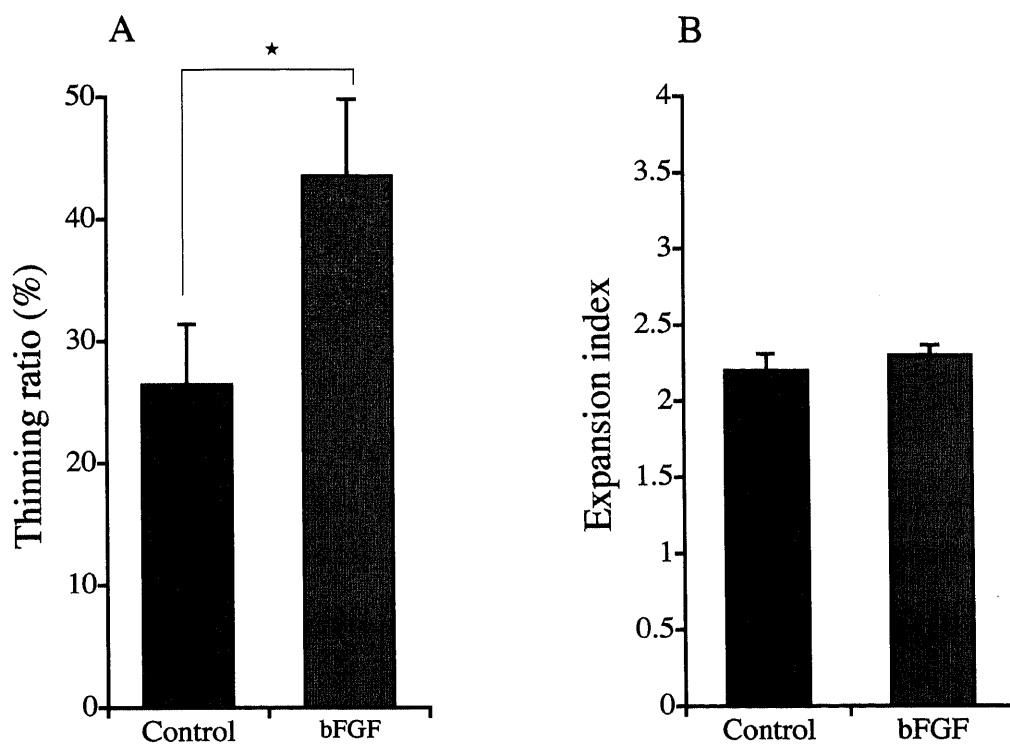


Fig. 11. Effects of bFGF treatment on vascular density in the border zone of infarcted area, expressed as numbers in $\times 200$ field (0.442 mm² per feild). (A) cappillaris (< 25 μ m). (B) arterioles ($\geq 25 \mu$ m). Each value represents $\bar{x} \pm$ SEM. Black column, the control group; Shaded column, the bFGF-treated group. \star , $P < 0.05$ versus control group by Mann-Whitney's U test.

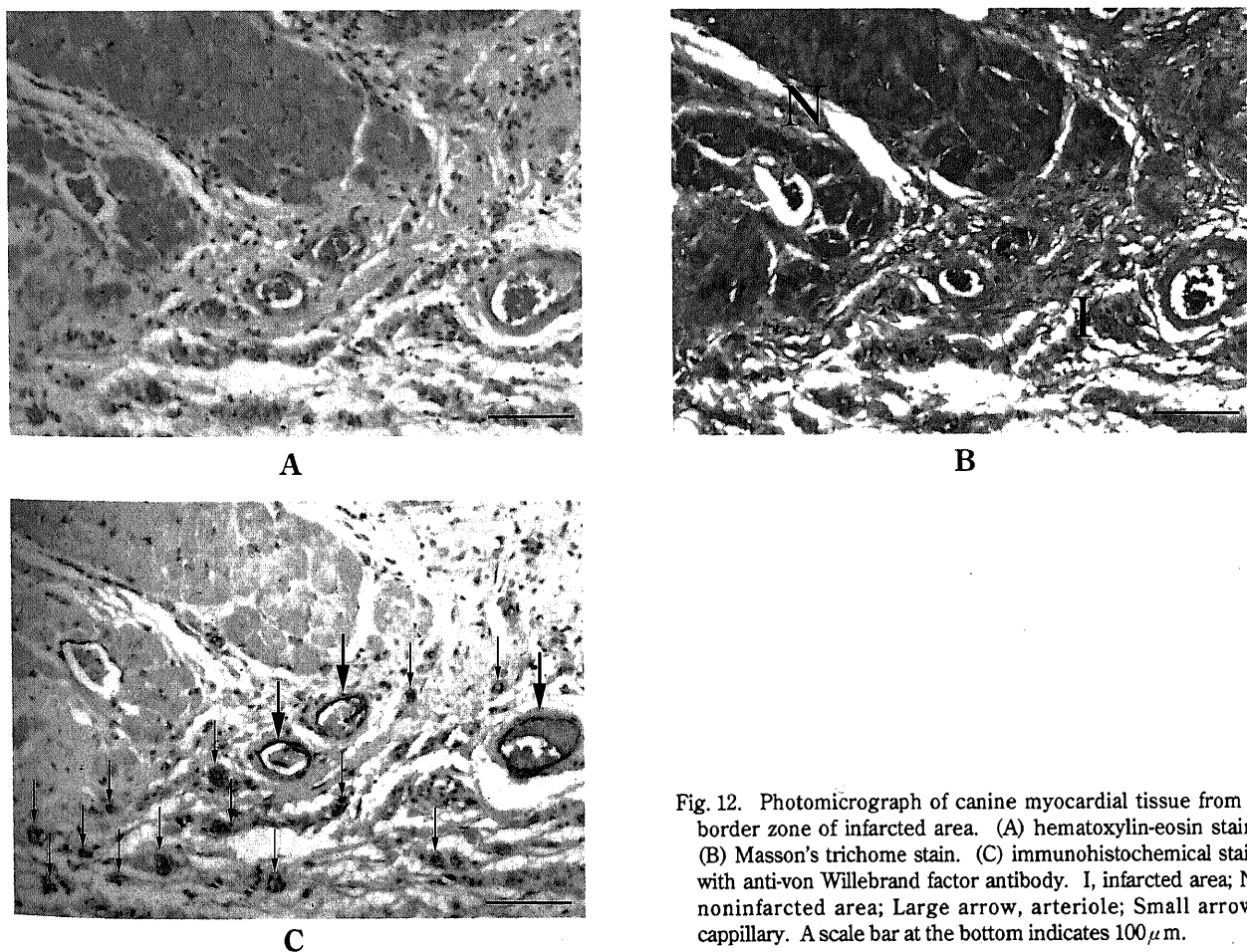


Fig. 12. Photomicrograph of canine myocardial tissue from a border zone of infarcted area. (A) hematoxylin-eosin stain. (B) Masson's trichome stain. (C) immunohistochemical stain with anti-von Willebrand factor antibody. I, infarcted area; N, noninfarcted area; Large arrow, arteriole; Small arrow, cappillary. A scale bar at the bottom indicates 100 μ m.

に毛細血管数の増加を認めた ($p=0.004$) (図11A). 梗塞境界領域における細動脈数は対照群で 2.33 ± 0.33 個/一視野, FGF群で 4.50 ± 0.43 個/一視野であり, bFGF群で有意に細動脈数の増加を認めた ($p=0.012$) (図11B) (図12).

考 察

本研究により, イヌ冠状動脈結紮による急性心筋梗塞モデルにおいて, 心筋内投与したbFGFは虚血心筋における血管新生を促進し, 梗塞並びに梗塞境界領域の心筋血流量を増加させ, 梗塞後左室再構築過程で心室壁非薄化と心室拡大を抑制し, 慢性期心機能を改善することが示された.

臨床では冠状動脈の慢性完全閉塞症例で豊富な側副血行により狭心症状が軽微であることがしばしば経験される. また急性心筋梗塞においても側副血行が発達していれば心筋壊死範囲が小さく心機能も良好に保たれることが報告されており¹⁷⁾, 側副血行発達の良否は虚血性心疾患の重要な予後因子である. 冠側副血行が形成される機序として, 生来存在する側副血管 ($40 \sim 100 \mu\text{m}$) が平滑筋層を有する小動脈 ($100 \mu\text{m} \sim 1\text{mm}$) に成長する脈管形成 (vasculogenesis) と, 生来の側副血管から血管内皮細胞の遊走・増殖・管腔形成過程を経て毛細血管が新生される血管新生 (angiogenesis) の二つの説が提唱されている. 種属による違いはあるが, 実際には両方の機序が同時に作用し, 側副血行形成に関与すると考えられる¹⁸⁾.

側副血管の成長刺激として, 従来は冠状動脈閉塞によって生じる動脈間圧較差や血流速度増大に伴う血管壁張り応力の増加などの, 脈管形成の機序に作用する物理的因子が重要視された⁴⁾⁵⁾⁶⁾. しかし, 現在では血管新生・脈管形成のいずれの機序も内皮細胞や平滑筋細胞などの細胞増殖を伴う過程であり, 心筋組織で発現する各種の細胞増殖因子に制御されていることが解明されつつある. 細胞増殖因子の発現を促進するものとして心筋虚血刺激が注目されており, Chilianら¹⁹⁾の微小塞栓モデルや, Ungerら²⁰⁾の虚血心筋に内胸動脈を植え込む実験モデルでも血管新生における虚血刺激関与の重要性が報告された. 細胞増殖因子の研究が進むにつれて, 心筋組織中に血管新生作用を有する細胞増殖因子として, FGF, VEGF, 形質転換増殖因子 β , 腫瘍壊死因子 α の存在が報告され, これらの細胞増殖因子は虚血刺激でその産生が増加することも証明された²¹⁾.

各種細胞増殖因子の中でもFGFファミリーが心筋組織内に豊富に存在することが報告され, その作用が注目されるようになったが, 三輪ら²²⁾はイヌ冠状動脈結紮による急性心筋梗塞モデルを作成し, bFGFの免疫組織染色を行いその分布の変化を経時的に調べ, 冠閉塞24時間以後に梗塞巣では非梗塞巣に比べ有意にbFGFの含量が増加し, 梗塞巣周辺に毛細血管が出現していることを報告した. さらにYanagisawa-Miwaら¹³⁾はイヌ急性心筋梗塞モデルにおいてbFGFを正常領域の冠状動脈内に投与し, 1週間後に梗塞周辺部における細動脈・毛細血管レベルの血管数の増加と心筋梗塞サイズの縮小を報告した. この血管新生因子投与による梗塞サイズ縮小効果は急性心筋梗塞に対する新しい治療法として大きな反響を呼んだが, これに対してUngerら²³⁾やBanaiら²⁴⁾は, 急性心筋梗塞ではなく, アメロイド狭窄器を使用した慢性心筋虚血モデルにおいて, 血管新生因子投与による局所心筋血流量の増加を報告した. そして, 急性心筋梗塞では血管新生作用の効果が出現する前に心筋細胞壊死が

完成することから, bFGFの血管新生作用による梗塞サイズ縮小効果の矛盾点を指摘した²⁵⁾.

一般に心筋梗塞サイズは責任冠状動脈の灌流域の大きさと再灌流までの時間により決定される. 冠状動脈を結紮した場合, 心筋壊死は灌流域の心内膜側に始まり心外膜側に向かい時間経過とともに波状に拡大し, これは波先現象 (wave-front phenomenon) と呼ばれる. 心内膜側は心外膜側より壁応力が高く酸素需要が高いこと, 心外膜側は心内膜側より側副血行が豊富であることなどが原因と考えられている. 波先現象はほぼ6時間で完成するため, 臨床的にも冠血行再建による梗塞サイズの縮小効果が期待できるのは6時間以内とされている²⁶⁾. 一方, 心筋梗塞部や梗塞周辺部における血管新生は3~5日以降に起こり, 2週目がピークと言われる²⁶⁾. 虚血刺激により心筋組織では1時間で各種細胞増殖因子のmRNAが増加し, 6時間で境界領域に増殖因子が発現するが, 血管新生が始まるのは, 遅れて3日後からとも報告されている²⁷⁾. 外因性血管新生因子投与の効果はより早期に生じると考えられ, Miyatakaら²⁸⁾はイヌ冠状動脈結紮モデルで, bFGF投与による虚血領域の心筋血流量増加は12時間後まで認めなかったと報告している. 本研究では梗塞周辺領域心内膜部で心筋血流量の増加を認めたのは3日後であった. すなわち血管新生作用によっては冠状動脈結紮後の虚血心筋を救済できる程早期に血流を回復できないと考えられた.

bFGFによる培養細胞の生存期間延長効果²⁹⁾, アポトーシス抑制効果³⁰⁾の報告より, Horriganら³¹⁾はbFGFの細胞保護効果が虚血心筋を救済する可能性を指摘している. またbFGFが血管内皮細胞にNO産生を促し, 冠微小循環の血管拡張因子として, 虚血心筋に対して保護的に作用することも報告されている³²⁾. 梗塞早期の心筋壊死の大きさは心筋逸脱酵素で定量化されるが, 本研究では冠血流遮断24時間後のトロポニンT値と比較すると, 対照群とbFGF群との間で有意な差は認めなかった. 従って心筋壊死量という観点で梗塞サイズを捉えた場合, bFGFの効果は梗塞サイズ縮小をもたらすほど早期には発現しないと考えられた. Yanagisawa-Miwaら¹³⁾, Uchidaら¹⁶⁾, Horriganら³¹⁾, Miyatakaら²⁸⁾は急性心筋梗塞モデルを用いた実験で, 瘢痕組織の大きさを定量し梗塞サイズの縮小効果を報告したが, 梗塞慢性期に病理組織学的に瘢痕組織の大きさを定量し梗塞サイズとする方法では, 心筋梗塞治療過程で生じる瘢痕組織の量, 形状の変化を考慮していないため, 梗塞早期に生じる心筋細胞障害の指標とはならないと考えられた.

本研究ではbFGF心筋内投与による血管新生作用を局所心筋血流量と血管数によって評価した. まず, 局所心筋血流量の変化をみると, bFGF投与によって梗塞領域では心外膜側で血流増加を認めたが, 心内膜側では有意な増加は認めなかった. 心内膜側が心外膜側より虚血侵襲に弱く, 梗塞が進展し易く, さらに血流回復が外膜側より劣ることは従来より報告されている³³⁾. そのため本研究ではbFGFを直接的に心筋に作用させる投与方法を選択したが, 効果は梗塞部心内膜側の血流を回復させるには不十分と考えられた. 一方, 左室前側壁の梗塞境界領域では, 対照群で冠状動脈結紮直後から1週間後まで心内膜部血流がさらに減少したのとは対照的に, bFGF投与群では心内膜部血流の増加を認め, 3日, 7日後で対照群より有意に高値であった. さらに病理組織学的には, bFGF群で梗塞境界領域を中心に多

くの細動脈ならびに毛細血管造成像を認めており、bFGF投与による血管新生作用は明らかであった。一般的に急性心筋梗塞における血管新生は2週間後を頂点に以後減少するといわれるが²⁹⁾、本研究では4週間後の梗塞慢性期における病理組織像でも血管新生療法の効果を示すことができた。Uchidaら³²⁾、Watanabeら³⁴⁾も梗塞慢性期に血管新生像を検討し、bFGF投与群で良好であったと報告している。血管新生作用による末梢血管床の増加は梗塞慢性期まで残存し、境界領域の血流を維持すると考えられた。

急性心筋梗塞後に梗塞部及び非梗塞部を含めた左室の形態変化が生じる現象は梗塞後左室再構築 (left ventricular remodeling) と呼ばれ、心筋梗塞後の予後因子である³⁵⁾。左室再構築は、心筋梗塞発症早期より梗塞部に生じる壁の伸展・菲薄化と、心筋梗塞発症後数週から以後長期にわたって生じる非梗塞部の心肥大・拡大の二つの機序よりなる。このうち早期の左室再構築は、梗塞により機能低下した心臓においてFrank-Starling 機序により心拍出量を維持し血行動態を改善する代償機構であるが、長期的には心拡大が左室の壁応力を増加させ、更なる心拡大と非梗塞部心筋の肥大を引き起こす。そして左室拡大の進行とともに非梗塞部肥大心筋の壁運動は徐々に低下し、心不全や心臓死の危険性を増加させる。左室再構築の終末像は、いわゆる虚血性心筋症とよばれる病態である。左室再構築に影響を及ぼす因子としては、心筋梗塞サイズ、心筋壁応力、心筋梗塞部の治癒状態が挙げられる³⁵⁾。前述したように、血管新生作用によっては急性期心筋梗塞サイズの縮小効果は期待できない。bFGFには血管拡張作用も報告されており、これによる血圧低下が心筋壁応力の減少をもたらした可能性も考えられるが、その作用時間は数時間と短い。従って本研究では、bFGFの血管新生作用による緩やかな局所血流量の増加が心筋梗塞部の治癒状態に影響し、良好な心機能保持に働いたものと考えられる。

本研究では心エコーで心機能を経時的に測定し、局所心筋血流量の増加が心機能を保持する機序を検討した。さらに摘出心において算出した壁菲薄化率ならびに左室拡大指数を用いて左室再構築を定量化した。左室駆出率は対照群では冠状動脈結紮3日、1週間後と低下し続け、2週間後ようやく回復に転じた。興味深いことに、この左室駆出率の変化は左室前側壁の梗塞境界領域の心筋血流量の変化と対応していた。左室駆出率の低下は左室収縮末期容積の増加によるもので、梗塞部を含む虚血心筋の収縮力低下が原因であった。左室収縮末期容積の増加は梗塞周囲心筋の過収縮を伴い、心筋壁応力の上昇と心内膜側の更なる虚血を引き起こす。こうして、梗塞部が伸展、菲薄化されると同時に、梗塞境界領域の内膜側では虚血領域の拡大が生じると考えられた。この時期に、bFGFの血管新生作用は梗塞境界領域の心筋虚血を改善し、左室収縮末期容積の増加を抑制し、左室駆出率を改善させると考えられた。摘出心の形態学的評価ではbFGF群の壁菲薄率は対照群に比し低かったのに対し、左室拡大指数では差を認めなかった。壁菲薄率は梗塞後早期に生じる梗塞部の伸展、菲薄化の程度を、左室拡大指数は梗塞後晩期に生じる非梗塞部の心拡大を反映する。すなわち、bFGFの心筋内投与は心筋梗塞心外膜側の血流を増加させ、また梗塞境界領域心内膜部に生じる心筋虚血を改善し、その結果、梗塞部の壁伸展、菲薄化を抑制すると考えられた。左室拡大指数に差は認めなかつ

たが、対照群で左室収縮、拡張末期容積が4週間後に再び増加傾向を示しており、bFGFの局所心筋内投与は梗塞部の治癒促進を介して非梗塞部の代償性心筋肥大や心室拡大にも抑制的に働く可能性が推測された。

細胞増殖因子を用いた血管新生療法を臨床応用する上での問題点として、血管新生を主要病態とする疾患、すなわち固形悪性腫瘍、糖尿病性網膜症、慢性関節リウマチなどに及ぼす影響が挙げられる³⁶⁾。また、細胞増殖因子の投与は動脈内膜肥厚の進行に影響を及ぼすことも報告されている³⁷⁾。投与方法として報告されている冠状動脈内投与や経静脈的全身投与では、体動脈ならびに冠状動脈の硬化性病変への影響が危惧される。Lopezら³⁸⁾はヘパリン-アルギニン酸マイクロスフェアにbFGFを含有させ、心外膜局所埋め込み式の持続投与方法を報告しているが、最も虚血が強い心内膜側への効果に関して、心外膜からの浸透だけに依存する点に疑問が残る。また、最新ではアデノウイルスベクターを用いた血管新生因子の遺伝子治療の研究も行われている³⁹⁾⁴⁰⁾。本研究では全身ならびに冠状動脈への副作用を抑え、直接的かつ効果的な投与方法として心筋内投与を選択した。細胞増殖因子の心筋内投与は、慢性心筋虚血を対象にSchumacherら⁴¹⁾により臨床試験されている。副作用の発現を抑えた、より効果的な細胞増殖因子の投与方法が今後の課題である。

経皮的冠状動脈形成術やCABGによる冠血行再建が困難な重症の動脈硬化性冠状動脈疾患に対して、欧米では積極的に心臓移植が行われているが、わが国の現状では未だ治療の選択肢とはならない。

最近、レーザーで心筋貫通孔を作成し血行再建を行う経心筋レーザー血行再建術 (transmyocardial laser revascularization) が研究されているが⁴²⁾、その機序はレーザーによる心筋細胞障害が各種細胞増殖因子の発現を促し血管新生を誘導することにあると考えられるようになった⁴³⁾。虚血心筋に直接的に血管新生因子を投与し、側副血行形成により心筋虚血を改善させる血管新生療法は虚血性心疾患の新しい治療法としてその臨床応用が期待される。

結 論

イヌ冠状動脈結紮による急性心筋梗塞モデルを用いて、bFGFを心筋内に直接投与し、その効果を局所心筋血流量、左心機能、左室形態、病理組織像より検討した。

1. 局所心筋血流量はbFGF投与で梗塞境界領域心内膜側、ならびに梗塞領域心外膜側において良好な増加を認めた。梗塞境界領域心内膜側では冠状動脈結紮3日、1週間後、梗塞領域心外膜側では結紮1週間後に対照群に比し有意に高い心筋血流を認めた。
2. 心機能検査では対照群で左室収縮末期容積の増加により左室駆出率が低下したが、bFGF群では冠状動脈結紮1週間後に良好な左室駆出率を認めた。
3. 冠状動脈結紮12時間後の血清トロポニンT値はbFGF投与による差はなく、梗塞サイズの縮小効果は認めなかった。
4. 左室形態では、bFGF投与は梗塞心筋の壁菲薄化を有意に抑制した。病理組織学検査では、bFGF群で梗塞境界領域を中心に細動脈ならびに毛細血管数の増加を認めた。
5. 心筋内投与したbFGFは虚血心筋における血管新生を促進し、心筋血流量を増加させ、梗塞後左室再構築過程に働き、心機能の改善に有効であった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました渡辺洋宇教授に深甚なる謝意を捧げます。また、本研究を直接御指導、御教授頂きました川筋道雄助教授に深く感謝いたします。

最後に本研究の遂行にご協力いただいた金沢大学第一外科学教室員各位に厚くお礼を申し上げます。

文 献

- 1) Loop FD, Lytle BW, Cosgrove DM, Stewart RW, Goormasruc M, Williams GW, Golding LAR, Gill CC, Taylor PC, Sheldon WC, Proudfit WL. Influence of the internal-mammary artery graft on 10-year survival and other cardiac events. *N Eng J Med* 314: 1-6, 1986
- 2) Goy JJ, Eeckhout E, Burnard B, Vogt P, Stauffer JC, Hurni M, Stumpe F, Ruchat P, Sadeghi H, Kappenberger L. Coronary angioplasty versus left internal mammary artery grafting for isolated proximal left anterior descending artery stenosis. *Lancet* 343: 1449-1453, 1994
- 3) Jones RH, Kesler K, Phillips III HR, Mark DB, Smith PK, Nelson CL, Newman MF, Reves JG, Anderson RW, Calif RM. Long-term survival benefits of coronary artery bypass grafting and precutaneous transluminal angioplasty in patients with coronary artery disease. *J Thorac Cardiovasc Surg* 111: 1013-1025, 1996
- 4) Liebow AA. Situations which lead to changes in vascular patterns. *In Am Physiol Soc, Handbook of Physiology, Circulation*, 1st ed, p1251-1276, Washinton, DC, 1963
- 5) Kamiya A, Togawa T. Adaptive regulation of wall shear stress to flow change in the canine carotid artery. *Am J Physiol* 239: H14-H21, 1980
- 6) Rentrop KP, Cohen M, Blankle H, Phillips R. Changes in collateral filling immediately following controlled coronary artery occlusion by angioplasty balloon in man. *J Am Coll Cardiol* 5: 587-592, 1985
- 7) Pasyk S, Shaper W, Shaper J, Pasyk K, Miskiewicz G, Steinseifer B. DNA synthesis in coronary collaterals after coronary artery occlusion in conscious dog. *Am J Physiol* 242: H1031-H1037, 1982
- 8) Kumar S, West S, Shahabuddin S, Arnold F, Haboubi N, Reid H, Carr T. Angiogenesis factor from human myocardial infarcts. *Lancet* 2: 364-367, 1983
- 9) Kardami E, Fandrich RP. Basic fibroblast growth factor in atria and ventricles of the vertebrate heart. *J cell Biol* 109: 1865, 1989
- 10) Casscells W, Spier E, Sasse J, Klagsburn M, Allen P, Lee M, Calvo B, Chiba M, Haggroth L, Folkman J, Epstein S. Isolation, characterization, and localization of heparin-binding growth factors in the heart. *J Clin Invest* 85: 433-443, 1990
- 11) Gospodarowics D. Localization of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* 249: 123-127, 1974
- 12) Baird A and Böhlen P. Fibroblast growth factors. *In MBSporn, AB Roberts (eds), Peptide growth factors and their receptors I*, 1st ed, pl-369, Springer, Berlin, 1990
- 13) Yanagisawa-Miwa A, Uchida Y, Nakamura F, Tomaru T, Kido H, Kamijo T, Sugimoto T, Kaji K, Utsuyama M, Kurashima C, Ito H. Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor. *Science* 275: 1401-1403, 1992
- 14) Hale LH, Alker KJ, Kloner RA. Evaluation of nonradioactive, colored microspheres for measurement of regional myocardial blood flow in dogs. *Circulation* 78: 428-434, 1988
- 15) Jugdutt BI, Michorowski BL. Role of infarct expansion in rupture of the ventricular septum after acute myocardial infarction: a two-dimensional echocardiographic study. *Clin Cardiol* 10: 641-652, 1987
- 16) Uchida Y, Yanagisawa-Miwa A, Nakamura F, Yamada K, Tomaru T, Kimura T, Morita T. 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, 1995
- 17) Habib GB, Heibig J, Forman SA, Brown BG, Robert R, Terrin ML, Bolli R, The TIMI investigators. Influence of coronary collateral vessels on myocardial infarct size in humans: Results of phase I Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) Trial. *Circulation* 83: 739-746, 1995
- 18) Schaper W. Coronary collateral development: concepts and hypotheses. *In Schaper W, Schaper J (eds), Collateral circulation. heart, brain, kidney, limbs*, 1st ed, p41-64, Kluwer academic publishers, Boston, Dordrecht, London, 1992
- 19) Chilian WM, Mass HJ, Williams SE, Layne SM, Smith EE, Scheel KW. Microvascular occlusions promote coronary collateral growth. *Am J Physiol* 258: H1103-H1111, 1990
- 20) Unger EF, Sheffield CD, Epstein SE. Creation of anastomoses between an extracardiac artery and the collateral circulation. *Circulation* 82: 1449-1466, 1990
- 21) Sharma HS, Schaper W. The role of growth factors during development of a collateral circulation in the porcine heart. *In Schaper W, Schaper J (eds), Collateral circulation. heart, brain, kidney, limbs*, 1st ed, p123-147, Kluwer academic publishers, Boston, Dordrecht, London, 1992
- 22) 三輪篤子, 内田康美, 東丸貴信. Basic FGFと冠血管増生-イヌ心筋梗塞モデルにおける検討-. *脈管学* 32: 1229, 1992
- 23) Unger EF, Banai S, Shou M, Lazarous DF, Michael TJ, Scheinowitz M, Correa R, Klingbeil C, Epstein SE. Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in carine model. *Am J Physiol* 226: H1588-H1595, 1994
- 24) Banai S, Jaklitsch MT, Casscells W, Shou M, Shrivastav S, Correa R, Epstein SE, Unger EF. Effect of acidic fibroblast growth factor on normal and ischemic myocardium. *Circ Res* 69: 76-85, 1991
- 25) Reimer KA, Jennings RB, Tatum AH. Pathobiology of acute myocardial ischemia: metabolic, functional and ultrastructural studies. *Am J Cardiol* 52: 72A-81A, 1983
- 26) 岡田了三. 血管新生の形態学. B. 病的状態における血管新生形態学. 1. 虚血. 心筋梗塞. 血管新生療法編-基礎と臨床- (内田康美, 小塚 裕編), 第1版, 9-12頁, 真興交易医書出版部, 東京, 1997

- 27) Li J, Brown LF, Hibberd MG, Grossman JD, Morgan JP, Simons M. VEGF, flk-1, and flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol* 270: H1803-H1811, 1996
- 28) Miyataka M, Ishikawa K, Katori R. Basic fibroblast growth factor increased regional myocardial blood flow and limited infarct size of acutely infarcted myocardium in dogs. *Angiology* 49: 381-390, 1998
- 29) Tamm I, Kikuchi T, Zychlinsky A. Acidic and basic fibroblast growth factors are survival factors with distinctive activity in quiescent BALB/c 3T3 murine fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 3372-3376, 1991
- 30) Tilly JL, Billig H, Kowalski KI, Hsueh AJ. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol Endocrinol* 6: 1942-1950, 1992
- 31) Horrigan MCG, MacIsaac AI, Nicolini FA, Vince DG, Lee P, Ellis SG, Topol EJ. Reduction in myocardial infarction size by basic fibroblast growth factor after temporary coronary occlusion in a canine model. *Circulation* 94: 1927-1933, 1996
- 32) Kostyk SK, Kourembanas S, Wheeler EL, Medeiros D, McQuillan LP, D'Amore PA, Braunhut SJ. Basic fibroblast growth factor increases nitric oxide synthase production in bovine endothelial cells. *Am J Physiol* 269: H1583-H1589, 1995
- 33) Bishop SP, White FC, Bloor CM. Regional myocardial blood flow during acute myocardial infarction in the conscious dog. *Circ Res* 38: 429-438, 1976
- 34) Watanabe E, Smith DM, Sun J, Smart FW, Delcarpio JB, Roberts TB, Van Meter CH Jr, Claycomb WC. Effect of basic fibroblast growth factor on angiogenesis in the infarcted porcine heart. *Basic Res Cardiol* 93: 30-37, 1998
- 35) Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 81: 1161-1172, 1990
- 36) Folkman J, Klagsburn M. Angiogenic factors. *Science* 235 (4787): 442-447, 1987
- 37) Edelman ER, Nugent MA, Smith LT, Karnovsky MJ. Basic fibroblast growth factor enhances the coupling of intimal hyperplasia and proliferation of vasa vasorum in injured rat arteries. *J Clin Invest* 89: 465-473, 1992
- 38) Lopez JJ, Edelman ER, Stamler A, Hibberd MG, Prasad P, Caputo RP, Carrozza JP, Douglas PS, Sellke FW, Simons M. Basic fibroblast growth factor in a porcine model of chronic myocardial ischemia: a comparison of angiographic, echocardiographic and coronary flow parameters. *J Pharmacol Exp Ther* 282: 385-390, 1997
- 39) Giordano FJ, Ping P, McKirnan MD, Nozaki S, DeMaria AN, Dillmann WH, Mathieu-Costello O, Hammond HK. Intracoronary gene transfer of fibroblast growth factor-5 increases blood flow and contractile function in an ischemic region of the heart. *Nat Med* 2: 534-539, 1996
- 40) Mack CA, Patel SR, Schwarz EA, Zanzonico P, Hahn RT, Ilercil A, Devereux RB, Goldsmith SJ, Christian TF, Sanborn TA, Kovacs I, Hackett N, Isom OW, Crystal RG, Rosengart TK. Biologic bypass with the use of adenovirus-mediated gene transfer of the complementary deoxyribonucleic acid for vascular endothelial growth factor 121 improves myocardial perfusion and function in the ischemic porcine heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 115: 168-176, 1998
- 41) Schumacher B, Pecher P, von Specht BU, Stegmann Th. Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors. First clinical results of a new treatment of coronary heart disease. *Circulation* 97: 645-650, 1998
- 42) Frazier OH, Cooly DA, Kadipasaoglu KA, Pehlivanoglu S, Lindenmeier M, Barasch E, Conger JL, Wilansky S, Moore WH. Myocardial revascularization with laser. Preliminary findings. *Circulation* 92 [suppl II]: 58-65, 1995
- 43) Pelletier MP, Giaid A, Sivaraman S, Dorfman J, Li CM, Philip A, Chiu RC. Angiogenesis and growth factor expression in a model of transmural revascularization. *Ann Thorac Surg* 66: 12-18, 1998

Angiogenic Therapy of Acute Myocardial Infarction by Intramyocardial Injection of Basic Fibroblast Growth Factor Hiroshi Nagamine, Department of Surgery (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 – J. Juzen Med Soc., **108**, 336 – 348 (1999)

Key words basic fibroblast growth factor, collateral circulation, angiogenesis, myocardial blood flow, myocardial infarction, left ventricular remodeling

Abstract

Angiogenic growth factors play an important role in the development of coronary collateral circulation. Therapeutic angiogenesis using exogenous growth factors may be useful in patients with severe coronary artery disease in whom complete revascularization is difficult. The present study was performed to examine the effect of one-time intramyocardial injection of basic fibroblast growth factor (bFGF) on myocardial blood flow, vascular density, and ventricular morphology and function in a canine model of acute myocardial infarction. In 15 anesthetized dogs, myocardial infarction was induced by ligation of the left anterior descending coronary artery (LAD) distal to its first diagonal branch. In 6 of the dogs, human recombinant bFGF 100 μ g was injected at 8 sites of the ischemic area of the left ventricular wall between the LAD and left circumflex coronary artery, while the 9 other dogs served as controls. Myocardial blood flow was determined using the colored microsphere technique both before and immediately after coronary ligation and again 3, 7, 14, and 28 days after treatment. Myocardial blood flow was expressed as a percentages of the normal flow. Cardiac function was evaluated by repeated echocardiographic measurement. Morphometric analysis was performed in excised hearts by assessing the infarct expansion index and ratio of thinning of infarcted to non-infarcted areas. Angiogenesis was assessed by immunohistochemical stain with anti-von Willebrand factor antibodies. Treatment with bFGF increased endocardial collateral flow in the border zone and the disparity between bFGF-treated and control dogs was significant on day 3 ($74.5 \pm 5.2\%$ and $40.8 \pm 6.7\%$ in the bFGF and control groups, respectively, $p=0.007$), with a significant difference on day 7 as well ($71.5 \pm 9.0\%$ and $38.8 \pm 5.4\%$ in the bFGF and control groups, respectively, $p=0.012$). Treatment with bFGF increased the epicardial collateral flow in the infarcted zone and the disparity between bFGF-treated and control dogs was significant on day 7 ($67.4 \pm 8.6\%$ and $35.7 \pm 5.2\%$ in the bFGF and control groups, respectively, $p=0.011$). Histopathologic examination of the hearts 4 weeks after ligation revealed that treatment with bFGF significantly increased the number of capillaries (39.7 ± 2.3 and 22.7 ± 1.1 per $200 \times$ field in the bFGF and control groups, respectively, $p=0.004$) and arterioles (4.50 ± 0.43 and 2.33 ± 0.33 per $200 \times$ field in the bFGF and control groups, respectively, $p=0.012$) in the border zone. It improved the left ventricular ejection fraction on day 7 after infarction ($53.5 \pm 2.1\%$ and $37.3 \pm 2.5\%$ in the bFGF and control groups, respectively, $p=0.004$) and reduced the thinning ratio ($43.5 \pm 6.3\%$ and $26.4 \pm 5.0\%$ in the bFGF and control groups, respectively, $p=0.045$). One-time intramyocardial administration of bFGF enhanced collateral vascular development, significantly increased myocardial blood flow and consequently improved global ventricular function. These results suggest that this method has potential as a new therapeutic approach in the treatment of myocardial infarctions.