

氏名	さいき むねひろ 佐伯宗弘
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第460号
学位授与年月日	平成16年 3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	ラット重症虚血肢モデルにおける血流慢性化過程と血管新生因子の発現
学位論文審査委員	(主査) 井藤久雄 (副査) 久留一郎 應儀成二

## 学位論文の内容の要旨

近年、増加傾向のある閉塞性動脈硬化症 (arteriosclerotic obliterans : ASO) に対する臨床的な治療として、抗凝固療法や血行再建術が行われその有効性は確立されている。他方、標準的治療法により救肢できない重症虚血肢に対して血管新生療法が注目されている。しかし、有効性が確認されたとする血管新生療法の動物実験は大部分が急性虚血肢モデルを使用しており、加えて、壊死を伴わない軽症虚血である。臨床的には慢性虚血に血管新生療法が行われているが、慢性虚血に関する病態解明はいまだ不十分である。そこで、本研究では虚血重症度の異なるラット・モデルを作成し、急性虚血の慢性化過程における血流変化と内因性の血管新生因子の発現を解析した。

### 方法

8週齢のWistar系雄性ラット75匹を使用した。まず従来多用されている虚血肢モデル、すなわち右総大腿動脈とその分枝を結紮抜去したものを軽症虚血群とした。さらに開腹下に右総腸骨動脈の結紮切離を加えたものを重症虚血群とし、血管剥離のみ行った対照群の3群を比較検討した。虚血肢の肉眼的変化を観察し、虚血肢血流を測定した。また、虚血肢内転筋中のvascular endothelial growth factor (VEGF) とfibroblast growth factor-2 (FGF-2) 蛋白濃度をELISA法により測定した。さらに、アルカリ性フォスファターゼ染色による虚血肢内転筋の血管密度を検討した。

### 結果

重症群では5日目には100%が足趾壊死となったが軽症群、対照群では壊死は発生しなかった。大腿内転筋の血流量に関しては、重症群では28日目まで軽症群、対照群に比較して有意に血流が低下していた( $P < 0.01$ )。一方軽症群では14日目まで対照群に比べ有意に血流低下を認めたが( $P < 0.01$ )、21日目は有意差が消失した。下肢皮膚血流量も同様の結果であった。大腿内転筋のVEGF蛋白濃度は、重症群は1、3日目では軽症群、対照群に比較して有意に高値であった( $P < 0.01$ )。軽症群はいずれの時期においても対照群と有意差はなかった。他方、FGF-2蛋白濃度は重症群、軽症群ともに7日目に最高値となった。重症群は3日目には対照群より有意に高値となり( $P < 0.05$ )、さらに7日目には軽症群、対

照群より有意に高値であった。(P<0.05)。両因子ともに14日目以降では3群間で有意差は消失した。28日目の虚血肢内転筋の血管密度は軽症群、対照群は重症群に比較して有意に高値であった(P<0.05)。

## 考 察

現在、血管新生療法の実験で使用されている動物実験モデルは大部分が急性動脈閉塞による虚血肢モデルであり、通常、壊死を伴わない軽症虚血である。しかし臨床的に血管新生療法が行われているのは慢性動脈閉塞の壊死を伴う重症虚血肢であることから、本研究では臨床的な病態に近い慢性化重症虚血肢モデルを作成することとした。結果として大腿動脈と腸骨動脈を結紮することにより足趾壊死を伴い、かつ21日目以降も有意な血流低下を維持可能な、従来の軽症虚血肢モデルと異なる重症虚血肢モデルが作成できた。本実験モデルは方法論的に急性動脈閉塞ではあるが、急性虚血による血流変化が安定した21日目以降では慢性閉塞と共通する病態が存在すると考えられた。

次に血管新生因子に着目すると、VEGFの発現量は大腿内転筋の血流変化に連動し、重症虚血では血流変化に呼応して著増したが、軽症虚血では増加はない。この結果から作成した重症虚血肢モデルでは明かな虚血が得られたことが確認された。一方内転筋の血流変化からみると、FGF-2の蛋白発現量は血流増加と一致して7日目に最大となった。FGF-2は脈管形成が行われている局所において発現量が増大していることから、血管新生を含む側副路機能の促進に関与する可能性が考えられた。また重症虚血肢モデルでは、21日目以降は血流低下が継続するにもかかわらずVEGFやFGF-2の増加がないことが特徴的であった。すなわち慢性化した重症虚血とは、血流低下が存在するにもかかわらず内因性の血管新生因子が活性化されない病態とも考えられた。

## 結 論

本研究ではラット大腿動脈と腸骨動脈を結紮することにより足趾壊死を伴い、かつ21日目以降も有意な血流低下を維持可能な、重症虚血肢モデルを作成した。本モデルにおける大腿内転筋のVEGFあるいはFGF-2発現からみると、慢性化した重症虚血は血流低下が存在するにもかかわらず、内因性の血管新生因子が活性化されない病態であることが示唆された。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究ではラット大腿動脈と腸骨動脈を結紮することにより足趾壊死を伴い、かつ21日目以降も有意な血流低下を維持可能な、重症虚血肢モデルの作成に成功している。さらに、本モデルにおける大腿内転筋のVEGFあるいはFGF-2発現から、慢性化した重症虚血は血流低下が存在するにもかかわらず、内因性の血管新生因子が活性化されない病態であることを示唆した。本研究は近年増加しているヒト閉塞性動脈硬化症に対する臨床的治療の有効性を検証する実験モデルを確立したものであり、明らかに学術の水準を高めたものと認められる。