

田畑および研究分担者丸井が実施した。

3. プラスチック製医薬品容器試験法に基づいた試験の結果、ステリパウチでは灰化試験強熱残分が基準値を超えていた。また、灰化試験重金属の分析は白濁により分析不能であった。また、溶出物試験紫外スペクトルが高い値を示した。透明性試験は、遮光袋であるため基準値を大きく下回った。その他、鉛、カドミウム、スズ等の含量試験、溶出物試験、微粒子試験、漏れ試験、水蒸気透過性、無菌試験、エンドトキシン試験に逸脱は認められなかった。

表 1. プラスチック製医薬品容器試験結果

D. 考察

臨床試験の実施にあたり、使用する試験物の安全性ならびに品質の担保は必須である。これまでに、治験薬GMPグレードの無菌製剤室の整備を行って来たが、本年度は治験薬GMPに法った凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシートの製造法を確立し、試験物の安全性試験を実施した。無菌試験、エンドトキシン試験の結果から、局方の注射薬の基準を満たすと判断した。また、安全性試験の結果からも本製剤による毒性は観察されなかった。以上のことから、現時点において、凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシートの臨床使用に問題はないと判断される。徐放性や安全性の試験結果の詳細は、他の分担研究者の報告書で記載する。

一方、プラスチック製医薬品容器試験についてはいくつかの検査で規格外であった。強熱残分が高値であることから、材質に金属の混入が疑われる。重金属試験で白濁することから、亜鉛の混入の可能性が最も高い。また、毒性金属の鉛、カドミウム、スズ等は基準値以下であること、製剤は溶出の可能性の低い凍結乾燥品であることから、本結果の問題性は低いものと考えられる。また、溶出試験の紫外吸収スペクトルについても凍結乾燥品では問題とはならない。また、遮光容器であることから透明性試験は1%以下で妥当である。現段階において、特注で専用容器を製造することは困難であり、本試験結果より、開発初期の段階における凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシートの容器としてステリパ

ウチ（三田理科工業）の使用は妥当であると考えられる。今後、本容器保管条件における安定性試験を行い、使用期限を決定する予定である。

E. 結論

治験薬GMPに基づいた凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシートの製造方法を確立した。さらに、使用する容器を決定した。今後、安定性試験や品質試験の強化を進め、製造方法と規格を最終化して、臨床試験用凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルシートの製造を進める。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

1) 米澤 淳、岡 真千子、豊国 秀昭、乾賢一、桂 敏也：治験薬GMP基準を満たす第3項先進医療（高度医療）用院内特殊無菌製剤の製造 日本薬剤学会第26年会、平成23年5月29日、東京

2) 豊国 秀昭、岡 真千子、米澤 淳、桂敏也：滅菌バリデーションの実施による臨床試験用院内製剤の無菌性保証 第21回日本医療薬学会年会、平成23年10月1日、神戸

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧

書籍

1. 【冠動脈疾患(上)-診断と治療の進歩】 冠動脈疾患における治療学の進歩 冠動脈バイパス術(CABG) 冠動脈バイパス術の変遷と現状 概論 丸井晃, 坂田隆造 日本臨床 69 巻増刊 7 冠動脈疾患(上) Page390-397

雑誌

1. Bir SC, Esaki J, Marui A, Sakaguchi H, Kevil CG, Ikeda T, Komeda M, Tabata Y, Sakata R. Therapeutic treatment with sustained-release platelet-rich plasma restores blood perfusion by augmenting ischemia-induced angiogenesis and arteriogenesis in diabetic mice. *J Vasc Res*. 2011;48(3):195-205.
2. Tsubota H, Marui A, Esaki J, Bir SC, Ikeda T, Sakata R. Remote postconditioning may attenuate ischaemia-reperfusion injury in the murine hindlimb through adenosine receptor activation. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2010 Dec;40(6):804-9.
3. Marui A, Kimura T, Tanaka S, Furukawa Y, Kita T, Sakata R; CREDO-Kyoto Investigators. Significance of off-pump coronary artery bypass grafting compared with percutaneous coronary intervention: a propensity score analysis. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2012 Jan;41(1):94-101.
4. Funakoshi S, Furukawa Y, Ehara N, Morimoto T, Kaji S, Yamamuro A, Kinoshita M, Kitai T, Kim K, Tani T, Kobori A, Nasu M, Okada Y, Kita T, Kimura T; CREDO-Kyoto Investigators. Clinical characteristics and outcomes of Japanese women undergoing coronary revascularization therapy. *Circ J*. 2011;75(6):1358-67.
5. Marui A, Kimura T, Tanaka S, Miwa S, Yamazaki K, Minakata K, Nakata T, Ikeda T, Furukawa Y, Kita T, Sakata R; CREDO-Kyoto Investigators. Coronary revascularization in patients with liver cirrhosis. *Ann Thorac Surg*. 2011 May;91(5):1393-9.
6. Yanagi S, Matsumura K, Marui A, Morishima M, Hyon SH, Ikeda T, Sakata R. Oral pretreatment with a green tea polyphenol for cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in an isolated rat heart model. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2011 Feb;141(2):511-7
7. Matsui M, Tabata Y. Enhanced angiogenesis by multiple release of platelet-rich plasma contents and basic fibroblast growth factor from gelatin hydrogels. *Acta Biomater*. 2012: in press.
8. Sugai M, Aoki K, Osato M, Nambu Y, Ito K, Taketo MM, Shimizu A. Runx3 is required for full activation of regulatory T cells to prevent colitis-associated tumor formation. *J Immunol*. 2011 Jun 1;186(11):6515-20.

9. Kitawaki T, Kadowaki N, Fukunaga K, Kasai Y, Maekawa T, Ohmori K, Itoh T, Shimizu A, Kuzushima K, Kondo T, Ishikawa T, Uchiyama T. Cross-priming of CD8(+) T cells in vivo by dendritic cells pulsed with autologous apoptotic leukemic cells in immunotherapy for elderly patients with acute myeloid leukemia. *Exp Hematol*. 2011 Apr;39(4):424-433.e2. Epub 2011 Jan 7.
10. Ido A, Moriuchi A, Numata M, Murayama T, Teramukai S, Marusawa H, Yamaji N, Setoyama , Kim ID, Chiba T, Higuchi S, Yokode M, Fukushima M, Shimizu A, Tsubouchi H. Safety and pharmacokinetics of recombinant human hepatocyte growth factor (rh-HGF) in patients with fulminant hepatitis: a phase I/II clinical trial, following preclinical studies to ensure safety. *J Transl Med*. 2011 May 8;9:55.
11. Shimada K, Mikami Y, Murayama T, Yokode M, Fujita M, Kita T, Kishimoto C. Atherosclerotic plaques induced by marble-burying behavior are stabilized by exercise training in experimental atherosclerosis. *Int J Cardiol*. 2011;151(3):284-289.
12. Shimada K, Murayama T, Yokode M, Kita T, Fujita M, Kishimoto C. Olmesartan, a novel angiotensin II type 1 receptor antagonist, reduces severity of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice associated with reducing superoxide production. *Nutr Meta Cardiovasc Dis*. 2011;21(9):672-678.
13. Tamura Y, Murayama T, Minami M, Yokode M, Arai H. Differential effect of statins on diabetic nephropathy in db/db mice. *Int J Mol Med*. 2011;28(5):683-687.
14. Noda H, Iso H, Yamashita S, Ueno H, Yokode M, Yamada N, Ouchi Y; Defining Vascular Disease (DVD) Research Group. Risk stratification based on metabolic syndrome as well as non- metabolic risk factors in the assessment of carotid atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2011;18(6):504-512.
15. Wada H, Ura S, Kitaoka S, Satoh-Asahara N, Horie T, Ono K, Takaya T, Takanabe-Mori R, Akao M, Abe M, Morimoto T, Murayama T, Yokode M, Fujita M, Shimatsu A, Hasegawa K. Distinct characteristics of circulating vascular endothelial growth factor- α and C levels in human subjects. *PLoS One*. 2011;6(12):e29351.
16. Arai H, Ouchi Y, Yokode M, Ito H, Uematsu H, Eto F, Oshima S, Ota K, Saito Y, Sasaki H, Tsubota K, Fukuyama H, Honda Y, Iguchi A, Toba K, Hosoi T, Kita T; Members of Subcommittee for Aging. Toward the realization of a better aged society: messages from gerontology and geriatrics. *Geriatr Gerontol Int*. 2012;12(1):16-22.
17. Hattori T, Makiyama T, Akao M, Ehara E, Ohno S, Iguchi M, Nishio Y, Sasaki K, Itoh H, Yokode M, Kita T, Horie M, Kimura T. A novel gain-of-function KCNJ2

mutation associated with short-QT syndrome impairs inward rectification of Kir2.1 currents. *Cardiovasc Res.* 2012;93(4):666-673.

18. 【疾患治療とドラッグデリバリーシステム】 細胞増殖因子徐放化による血管新生治療 山本雅哉, 丸井晃, 坂田隆造, 田畑泰彦 細胞 44 巻 2 Page64-67
19. 下肢血管新生療法の臨床応用 丸井晃, 坂田隆造 日本医事新報 4553 号 Page62-63
20. 患者まで届く再生医療 生体吸収性担体を用いた重症下肢虚血に対する血管新生療法 丸井晃, 田畑泰彦, 柳茂樹, 山本雅哉, 米澤淳, 桂敏也, 手良向聡, 横出正之, 清水章, 中尾一和, 坂田隆造 再生医療 10 巻 1 号 Page37-44
21. 【虚血性心筋症に対する外科治療戦略】 虚血性僧帽弁閉鎖不全症に対する外科治療 山崎和裕, 南方謙二, 仲原隆弘, 船本成輝, 小田基之, 高井文恵, 武田崇秀, 村中弘之, 丸井晃, 三和千里, 池田義, 坂田隆造 胸部外科 64 巻 11 号 Page968-975
22. 【主幹部病変における冠血行再建術: PCI vs CABG】 左主幹部病変における冠血行再建 エビデンスをいかに解釈するか 丸井晃, 坂田隆造 日本冠疾患学会雑 17 巻 3 号 Page246-253
23. 冠動脈バイパス術と脳血管障害 丸井晃, 坂田隆造 日本冠疾患学会雑誌 17 巻 2 Page153-159

IV. 研究成果の刊行物・別刷

V. 冠動脈疾患における治療学の進歩

冠動脈バイパス術(CABG)

冠動脈バイパス術の変遷と現状：概論

Current status of surgical myocardial revascularization

丸井 晃 坂田隆造

Key words : 冠動脈バイパス術, CABG, off-pump, 動脈グラフト

はじめに

冠動脈バイパス術(CABG)は虚血性心疾患に対する外科治療のゴールドスタンダードの地位を築いているが、近年の経皮的冠動脈血行再建術(PCI)の技術的発展や薬剤溶出性ステント(DES)の登場に伴い、我が国におけるCABG施行数は2002年をピークにその後減少傾向となっている。また薬物治療の進歩も目覚ましく軽～中等度の冠動脈疾患ではPCIと遜色ない治療成績を示すことも報告されている。このような時代を迎えるに至って、本稿ではCABGの変遷と現状をふまえて、今後の冠動脈外科の方向性を論じてみたい。

1. 冠動脈外科の黎明期

心筋の虚血が狭心症状の原因になることは既に知られていたが、心筋に血液を供給する目的で1935年にClaude Beckは狭心症の患者の胸筋の有茎フラップを擦過した心膜に置き、虚血心筋に間接的に血液を供給するという方法を試みた。Vinebergは1940年代に狭心症の患者の内胸動脈を左心室心筋に直接埋め込みを行った。その後Sonesにより冠動脈造影法が開発されたことにより冠動脈狭窄や閉塞の部位が同定され、冠動脈に直接グラフトを吻合することが可能と

なった。Goetzは1960年に予定手術として初めて右内胸動脈-右冠動脈吻合に成功し、2週間後の血管造影でも開存を確認した。Sabistonは1962年に初めて大伏在静脈による冠血行再建を行い、1964年にはKolesovが体外循環を使用せず、左内胸動脈を左前下行枝に吻合したことが報告されている。

2. 人工心肺装置の発展と合併症

黎明期のCABGは心拍動下に行われていたが、その後Gibbonらにより人工心肺装置が臨床応用され(図1)、更に心筋保護法の確立により一定時間の心停止が可能となり、心臓手術における静止野・無血野が得られるようになった。1968年にはFavaloroらによる患者15人の冠動脈血行再建が報告され、Johnsonらは1969年に静脈グラフトによる患者301人の報告を行った。これらの良好な治療成績により現代に通じる冠動脈外科が幕を開けることとなった。1970年代には3つの大規模トリアルであるCoronary Artery Surgery Study(CASS), Veteran's Administration Coronary Artery Bypass Trial, European Coronary Artery Bypass TrialによりCABGの生命予後改善効果が証明された。また、左主幹部病変(LMT)・3枝病変・低左心機能などの重症患者での生命予後改善効果も証明され、

Akira Marui, Ryuzo Sakata: Department of Cardiovascular Surgery, Kyoto University Graduate School of Medicine
京都大学大学院医学研究科 心臓血管外科

0047-1852/11/¥60/頁/JCOPY

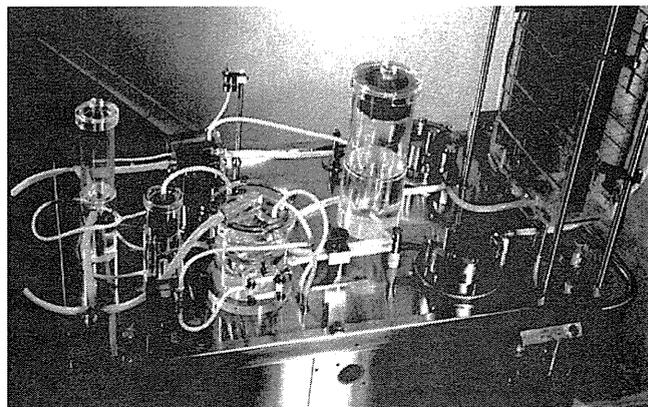


図1 Mayo Clinic-Gibbon スクリーン型人工肺

(新見能成(著・翻訳): 人工心肺—その原理と実際—, メディカルサイエンスインターナショナル, 2010. より引用)

CABGは虚血性心疾患に対する治療法としての地位を確立することになる。

しかしながら次第に人工心肺装置による弊害も判明してきた。血液を人工心肺装置に循環させることにより、炎症性物質の活性化・血球成分の破壊・凝固因子の消費などによる凝固異常・免疫系への悪影響、更に血液希釈や低圧循環による全身および諸臓器の浮腫・臓器虚血障害など様々な弊害が指摘されるようになった。また体外循環を行うには上行大動脈から送血管を挿入する必要があり、心停止のためには上行大動脈を鉗子で遮断する必要があるが、特にCABGの対象となるような全身動脈硬化病変の強い患者では、上行大動脈操作により動脈硬化粥腫が飛散することにより脳梗塞の原因となることがあり、人工心肺によるCABGの合併症として問題となっていた。

3. 低侵襲化への流れ

人工心肺を使用せず心拍動下に冠動脈吻合を行う off-pump CABG は 1970 年代から行われていたが、体外循環技術の確立以降は人工心肺を使用した on-pump CABG が一般的となった。しかし上述の体外循環の弊害が広く認識されるようになり、また PCI の急速な進歩に伴い CABG にも低侵襲化が要求されるようになり、off-pump CABG が復活することになる。

1990年代になって Benetti や Buffolo らにより胸骨正中切開による off-pump CABG が報告されたが、その後更なる低侵襲性を求めて、Subramanin や Calafiore らによる皮膚小切開による off-pump CABG が行われるようになった。1995年には Benetti らにより左前左側方小開胸により off-pump で左内胸動脈(LITA)を左前下行枝(LAD)に吻合する、いわゆる MIDCAB が導入された。この低侵襲 CABG は欧米で急速に広まり、入院期間の短縮・医療費の削減・輸血量の減少や、良好なグラフト開存率が報告された。我が国でも 1990 年代後半に導入され急速に広まったが、初期成績が十分ではなく、その後 off-pump 用機器の進歩も重なって、胸骨正中切開による多枝 off-pump CABG が行われるようになる。正中切開による off-pump CABG は当初 LAD・鈍縁枝・右冠動脈主幹部にとどまっていたが、その後吸引型のスタビライザーや、Lima による背側心膜吊り上げ、冠動脈シャントチューブなどの様々な技術的・機器的進歩により、血行動態の安定を得ながら全冠動脈の吻合が可能となり(図2)、急速に多枝 off-pump CABG が広まった。日本胸部外科学会の年次報告¹⁾では全 CABG に占める off-pump の割合が 2001 年には約 30% を占め、その後も増加し 2004 年以降は約 60% が off-pump で施行されるようになった(表1)。

V

冠動脈疾患における治療学の進歩

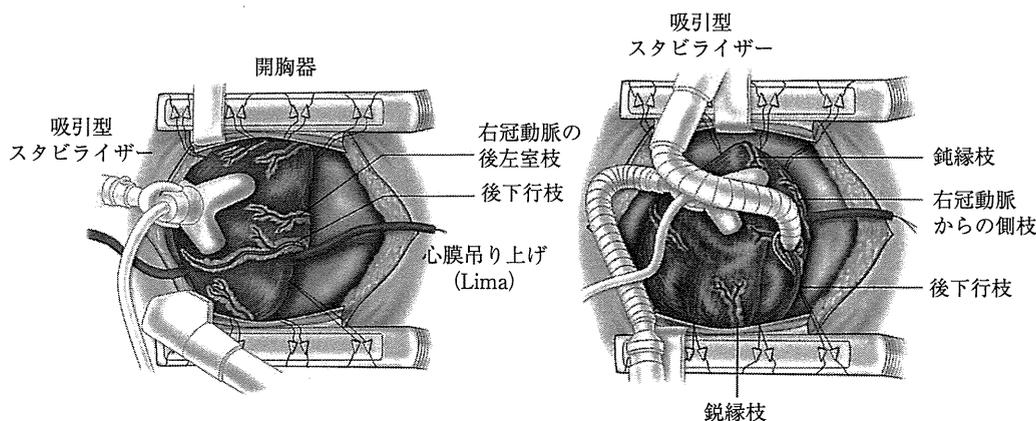


図2 胸骨正中切開による off-pump CABG (冠動脈の展開法)

(Sellke FW: Atlas of Cardiac Surgical Techniques: A Volume in the Surgical Techniques Atlas Series, Saunders, 2010. より改変)

表1 我が国における過去10年の単独CABGの推移 (日本胸部外科学会年次報告)

| | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 |
|--------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 総数 | 17,735 | 19,043 | 20,095 | 21,626 | 21,046 | 19,930 | 18,337 | 17,941 | 17,295 | 17,764 |
| 病院死亡率(%)* | 2.0 | 2.0 | 1.7 | 1.5 | 1.6 | 1.9 | 1.8 | 1.5 | 1.5 | 1.2 |
| off-pump率(%) | 16 | 26 | 29 | 46 | 55 | 60 | 61 | 61 | 63 | 63 |

*2002年以前は待機手術, それ以降は初回待機手術の死亡率.

4. Off-pump CABG

a. Off-pump CABG の偏在

しかしながら, 世界的な傾向をみると, 全CABG 施行数に対する off-pump CABG の割合は18-25%にとどまっておき, ドイツに至ってはわずか5%と報告されている. 北米でも20%程度となっており, しかも off-pump CABG を集中的に行っているごく一部の施設を除けば, ほとんどの施設の off-pump 率は5%未満と報告されている. 一方, 前述のように日本や中国・一部のヨーロッパでは高い off-pump 率を示している. このような症例の偏在の理由の一つとしては, 体外循環を使用する on-pump CABG に対する off-pump の優位性が現時点では明確には示されていないことが挙げられるであろう. より多くの外科医が off-pump CABG を選択するには, ①グラフトの開存性が少なくとも on-pump と同等であること, ②特にハ

イスク患者で死亡率および合併症率を減らすこと, ③医療経済的メリット, などを示すことが必要であるが, off-pump を優位とする報告の多くは単施設からの比較的少数患者によるものに限られている. これらの報告では潜在的な患者選択バイアスや, 死亡・脳梗塞・心筋梗塞などのハードエンドポイントを評価するには症例数が不足しており, メタ解析を行っても十分な統計学的妥当性が得られていないのが現状である.

最近報告された on-pump と off-pump CABG とのランダム化比較試験 ROOBY trial¹⁹⁾ では, 2,203 人の患者をランダムに on-/off-pump に割り付けているが, 30日以内の死亡および再手術・脳梗塞などの発症に差がなく ($p=0.19$), 術後1年以内の死亡・追加冠血行再建・心筋梗塞発症についてはむしろ off-pump の方が高かった ($p=0.04$). 1年後のグラフト開存率も off-pump で不良であり ($p<0.01$), 入院中の脳神経

学的合併症や医療費も差を認めないというものであった。この試験の欠点として、ランダム化比較試験という制約のため、対象患者が比較的低リスクであり、また在郷軍人病院という比較的経験の浅い若い術者が中心となって手術を行っていることが挙げられており、我が国のように各施設のトップ術者が多くの症例を手掛ける体制とは全く事情が異なるという指摘もある。

b. Conversion 症例の問題

実際我が国の off-pump CABG の周術期成績は良好であり、前出の日本胸部外科学会の2008年の年次報告書では初回待機手術に限れば off-pump CABG の30日死亡率は0.6%であり、一方 on-pump CABG は1.3%であった。対象症例が異なるため単純な比較はできないが、日本の off-pump CABG の治療成績は高レベルにあることはまちがいない。しかし、血行動態の悪化から術中に off-pump から on-pump CABG に移行したいいわゆる conversion 症例に目を向けてみると、同報告での30日死亡率は4.5%にも達しており非常に高率である。

また日本冠動脈外科学会の全国調査でも2009年度までは毎年低下していたCABGの死亡率が、2010年では単独CABG全体の死亡率が1.46%から2.12%に上昇するという結果が報告されている。この背景としては、conversion 症例の死亡率が6.42%と、前年の1.34%を大きく上回っており、これが全体の成績に大きく影響したことが挙げられている。前述の ROOBY trial²⁾でも conversion 症例が12.4%も認められており、つまり未熟な術者による conversion が off-pump の治療成績を悪化させていると考えられる。また同調査は脳梗塞発症についても conversion 症例で極めて高かったことを報告している。

c. Off-pump が必要な症例とは

しかし、conversion 症例による死亡率が再上昇したとはいえ、我が国の治療成績は依然高水準にあるのは事実であり、off-pump CABG は適応を選べば、非常に有用な手技であることに間違いはない。最近10年間の米国における CABG 前の予測死亡率と術後の実際の死亡

率との関係をまとめた Puskas らの報告によると³⁾、Society of Thoracic Surgeons (STS) データベースによる14,766の連続症例について、術後30日以内の予測死亡率別に4段階にリスク階層化を行ったところ、低リスクの2群については off-pump と on-pump で手術死亡率は差がなかったが、高リスクの2群では死亡率が有意に off-pump で低かった。また on-pump CABG を受けた患者では、予測死亡率の上昇に伴い、実際の死亡率も上昇しているが、off-pump では予測死亡率が上昇しても実際の死亡率はほとんど変わらなかった(図3)。つまり早期成績に関しては、高リスク症例ほど off-pump が威力を発揮することが示された。今後は早期のみならず長期成績の検討を十分に行い、CABG 全体の治療成績改善のためにも off-pump と on-pump、または場合により on-pump での心拍動下の CABG を、個々の患者の状態に合わせて最適な治療法を選択することが必要であろう。

5. グラフト選択

a. 動脈グラフトの時代へ

CABG のグラフト選択については、1980年代まで大半が大伏在静脈グラフト(SVG)であったが、その後 SVG に対する内胸動脈(ITA)グラフトの優位性が報告されるようになった。1985年に Barner は ITA が SVG に比べて長期開存性が優れていることを報告し、1986年には Loop が、LITA-LAD バイパスが SVG-LAD バイパスに対して10年の死亡率・心筋梗塞発症率・心イベントによる入院を減少させることを報告した。現代でも LITA-LAD バイパスは CABG におけるゴールドスタンダードとなっている。

静脈グラフトに対する動脈グラフトの優位性が認識されるにあたって、その後様々な動脈グラフトが使用されることになった。橈骨動脈は1970年代に Carpentier により初めて報告されたが、グラフト攣縮を機械的に拡張していたこともあり、2年の開存率が32%と不良で、その後一時使用されなくなった。しかし Acar は1989年に適切な採取を行えば良好な中期・長期成績が得られることを報告し、橈骨動脈はグ

V

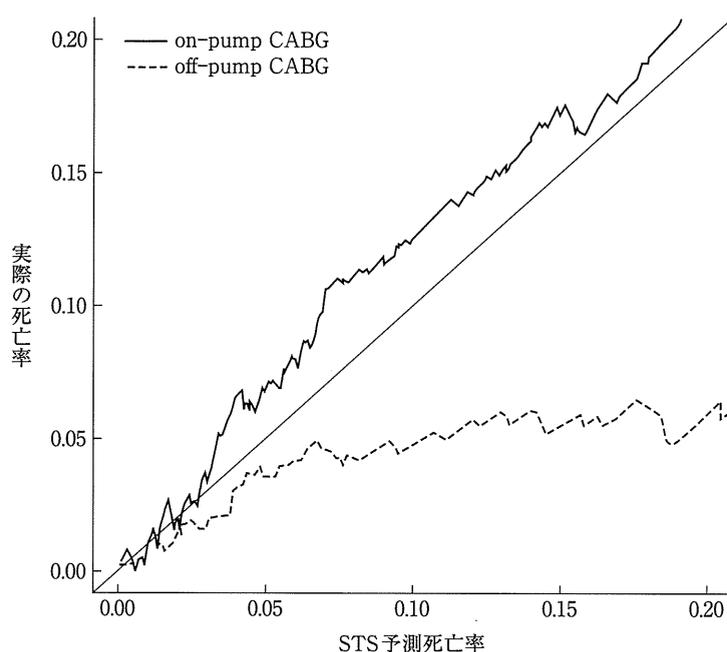


図3 STS データベースにおける予測死亡率と実際の死亡率の関係 (on-pump vs off-pump) (文献³⁾より改変)

ラフトとして復活を遂げた。その後2004年のランダム化比較試験のRadial Artery Patency Studyは、静脈グラフトと比較して1年後の橈骨動脈の閉塞は少なかったが、ストリングサイン(閉塞はしていないものの糸のようにやせて血管機能を果たさない形状)は橈骨動脈に有意に多かったことを報告した。また閉塞やストリングサインはより狭窄の軽い標的冠動脈が多かったことが報告されており、標的冠動脈の狭窄度合いによって血流競合が起こることにより橈骨動脈の開存性が左右されることが指摘された。現在でも静脈グラフトに対する優位性は十分には証明されておらず、橈骨動脈は高度な動脈硬化病変が及んでいることも多く、近年の橈骨動脈からのカテーテル手技の影響もあり、橈骨動脈の性状が不良で使用できないことも少なからず存在する。また透析患者もしくは将来的に透析が予想される患者で使用できず、また前腕に大きな傷跡が残ることも美容的に問題であり、使用が限られているのが現状である。

右胃大網動脈(RGEA)グラフトは1980年代

にPymとSumaらにより報告された。しかし開腹操作が必要となり手術時間の延長、周術期・遠隔期の腹部合併症のリスクもあり、使用機会は限られている。また遠隔成績もごく一部の施設からのものに限られており、静脈グラフトに対する優位性は十分に証明されていない。またRGEAも橈骨動脈同様に標的冠動脈の狭窄度合いにより開存性が左右されることが報告されており、全動脈グラフト再建が必要な場合の第2・第3グラフトとしてや、再手術などであくまで他のグラフトが使用できない場合などに限られている。

b. 全動脈グラフト再建はどこまで有用か

1980年代まで多用されていたSVGはグラフト劣化(vein graft disease)を起こしやすく長期開存性に問題があることが明らかになってきたことや、ITAの高い長期開存性が報告されるようになり、動脈グラフトを優先的に使用する機運が一気に高まり、一時はすべての冠動脈再建を動脈グラフトのみで完遂することが最も良いCABGであり、off-pump CABGの急速な普及

と重なって‘全動脈グラフトによる off-pump CABG’が万能であるかのような風潮さえあった。

しかし前述のように、ITA以外の動脈グラフトに関しては、標的冠動脈の狭窄度が低い場合や、コンポジットグラフト(目的のCABGに合わせてグラフト同士を継ぎ足してグラフトデザインを行うこと)で吻合部が多い場合は早期の不全発生率が高いことが報告され、また上述のようにITA以外の動脈グラフトの長期開存性がSVGより優位である点が明確でないことも判明してきた。全動脈グラフトによるCABGの優位性も一部の施設からの報告に限られており、現時点では有用性が十分証明されているとはいえない。そのような経緯もありSVGは再び見直されつつある。SVGはgraft diseaseの問題は存在するものの、採取が容易で冠動脈全域に使用でき、動脈グラフトに比べて径が太いことから冠動脈の狭窄度にかかわらず使用可能であることからITAと並んで最も使用されるグラフトとなっている。ITA以外の動脈グラフトに関しては標的病変の狭窄度などを考慮し慎重に適応を決定する必要がある、SVGとうまく使い分けことが開存率向上の鍵となると考えられる。

6. 薬物治療・PCIとの比較

a. 薬物療法 vs CABG

1994年のYusufらによるメタ解析では左主幹部病変(LMT)を含む慢性冠動脈病変においてCABGは薬物治療に比して長期の生命予後改善効果があることが示され、特にLAD近位部病変をもつ患者で顕著であった。しかしながら薬物治療もスタチンやアンジオテンシン受容体拮抗薬などが用いられておらず、そのまま現代にあてはめることには無理がある。しかし28トライアルの13,121人の安定狭心症患者を対象とした最近のメタ解析でも薬物治療に対するCABGの優位性が報告された。更にこれらのトライアルは①薬物治療群を含む性質上、比較的重症度の低い冠動脈病変であった、②当時のITA使用率は10%未満で、周術期死亡率も最近の成績と比して高かった、③intension-

to-treatを採用しているため、薬物治療群の約40%が最終的にCABGを受けていたこと、などが反映されていないという指摘もありCABGの優位性が過小評価されている可能性があることは十分に考慮しなければならない。

b. PCI vs CABG

PCIとCABGの比較については、従来の‘3枝病変・LMT=CABG’という図式から、PCIの技術的進歩やDESの出現により、状況は急速に変わりつつある。多枝病変についてはバルーン拡張術のみの時代やベアメタルステント時代の高い再狭窄率からPCIが敬遠され、CABGが第一選択とされていた。しかしその後様々なランダム化比較試験により死亡・心筋梗塞などのハードエンドポイントについてもCABGとPCIで有意差を認めない報告が相ついだ。一方実際の臨床現場を反映しているといえるレジストリ試験ではCABGの優位性を示す報告が多く、New York Cardiac RegistryやNorthern New England Registryなどの報告ではCABGの優位性が報告され、特に3枝病変やLAD近位部病変を含む症例では優位性が大きかった。この理由としてランダム化比較試験における過剰な患者選択バイアスによりハイリスクの患者が除外されていることが挙げられている。その欠点を補うべくSYNTAX試験⁴⁾は、すべての患者がランダム治療群またはレジストリ群に登録されるというall-comer designを取っている。3枝病変に対する3年追跡の結果は、心血管イベントはPCI群で高く、死亡や心筋梗塞といったハードエンドポイントにおいてもCABGで少なく、この差は冠動脈病変の複雑さの指標であるSYNTAXスコアの高低にかかわらず一定であり、複雑な多枝病変においては依然としてCABGの優位性が示されている。

一方、LMTについては以前はCABGの独壇場であったが最近PCIの良好な早期・中期成績が報告されるようになり、LMTに対するPCIの頻度は確実に増加してきている。MAIN-COMPAIRE Registryの5年成績では、非保護左主幹部病変(UPLMT)に対する追加血行再建の頻度は依然PCIで高いものの、死亡や複合イベ

V

表 2 ESC/EACTS ガイドラインにおける安定狭心症患者に対する
PCI と CABG の適応 (文献⁹⁾より改変)

| 解剖学的分類 | CABG 選択 | PCI 選択 |
|--|---------|--------|
| 1 または 2 枝病変 (LAD 近位部病変なし) | IIb C | I C |
| 1 または 2 枝病変 (LAD 近位部病変あり) | I A | IIa B |
| 3 枝病変 (SYNTAX スコアが 22 以下の単純病変で、かつ PCI により十分な機能的血行再建が達成される場合) | I A | IIa B |
| 3 枝病変 (SYNTAX スコアが 22 を超える複雑病変で、かつ PCI による不完全血行再建が予測される場合) | I A | III A |
| 左主幹部 (孤立性もしくは 1 枝病変でかつ入口部・シャフト部病変) | I A | IIa B |
| 左主幹部 (孤立性もしくは 1 枝病変でかつ遠位分岐部病変) | I A | IIa B |
| 左主幹部 (2 または 3 枝病変で SYNTAX スコアが 32 以下) | I A | IIa B |
| 左主幹部 (2 または 3 枝病変で SYNTAX スコアが 33 以上) | I A | III B |

ント (死亡・心筋梗塞・脳梗塞) についても有意差を認めなかった。また SYNTAX 試験における UPLMT の 3 年成績でも死亡・心筋梗塞発症に有意差を認めなかった。しかし我が国の DES についての多施設研究である j-Cypher registry では、左主幹部入口部およびシャフト部の病変では良好な成績が見込まれる一方で、複数のステントを要する真性分岐部病変では依然として PCI の成績が不良であることが報告されている。また SYNTAX 試験においても SYNTAX スコアが高いハイリスク群では PCI で有意に心血管イベントの発生率が高いことが報告されている。これらより全身状態が不良で CABG を回避したい患者では、LMT であっても解剖学的に PCI に適していれば選択可能であると考えられるが、解剖学的に PCI が困難な場合は CABG 選択を考慮すべきであろう。

7. ガイドライン策定に向けて

2010 年に発表されたヨーロッパ心臓病学会とヨーロッパ心臓胸部外科学会との合同冠血行再建ガイドライン⁹⁾では、CABG は LAD 近位部病変を含まない 1-2 枝病変以外はすべて class I A の適応であり、PCI は前述の病変が class I C で、他はすべて II B 以下となっている (表 2)。特に 3 枝病変で SYNTAX スコアが 22 を超える病変と LMT を含む 2 枝以上の病変で SYNTAX スコア 33 以上では PCI を行うべきでないとき

れている。このように最新のエビデンスレベルの高い報告を反映しているガイドラインでも、PCI の過大適応に歯止めをかけ、CABG の有用性を再評価する内容となっている。

一方、我が国においてはまだ内科外科合同によるエビデンスに基づいたガイドラインは作成されておらず、我が国発のエビデンスレベルの高い報告も限られている。その中でも我が国初の初回冠血行再建患者の多施設レジストリである CREDO-Kyoto⁹⁾では、多枝病変患者では総死亡について CABG が優位な傾向があり ($p=0.06$)、また、糖尿病患者や低左心機能患者などサブグループ解析でも CABG の優位性が報告された (それぞれ $p=0.04$, $p=0.02$)。更に LMT をもつ患者も対象に含めると、総死亡についても CABG が有意差をもって低く ($p<0.01$)、海外の報告同様に real world を反映しているレジストリ試験における CABG の優位性が報告された⁷⁾。今後はこれら我が国独自のエビデンスによるデータを中心に、客観的視点に基づいた患者本位のガイドラインを策定することが急務と考える。

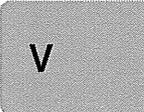
おわりに

DES の出現により CABG は消滅してしまうのではないかと危惧されたが、エビデンスの検証を重ねることにより、決して DES も万能ではなく CABG の有用性が再認識されたことは

非常に意義深い。今後は‘どの治療法が優れているか’という概念を改め、‘この患者に本当に最適な治療法は何か’ということを常に念頭に置くことが肝要であり、外科医はCABGの治療成績を向上させるためにたゆまぬ努力を続けることが、今後の冠疾患治療全体の発展につながると考える。

■ 文 献

- 1) Sakata R, et al: Thoracic and cardiovascular surgery in Japan during 2008: annual report by The Japanese Association for Thoracic Surgery. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 58: 356-383, 2010.
- 2) Shroyer AL, et al: On-pump versus off-pump coronary-artery bypass surgery. *N Engl J Med* 361: 1827-1837, 2009.
- 3) Puskas JD, et al: Off-pump coronary artery bypass disproportionately benefits high-risk patients. *Ann Thorac Surg* 88: 1142-1147, 2009.
- 4) Serruys PW, et al: Percutaneous coronary intervention versus coronary-artery bypass grafting for severe coronary artery disease. *N Engl J Med* 360: 961-972, 2009.
- 5) Kolh P, et al: Guidelines on myocardial revascularization. *Eur J Cardiothorac Surg* 38(Suppl): S1-S52, 2010.
- 6) Kimura T, et al: Long-term outcomes of coronary-artery bypass graft surgery versus percutaneous coronary intervention for multivessel coronary artery disease in the bare-metal stent era. *Circulation* 118(Suppl): S199-209, 2008.
- 7) Marui A, et al: Significance of off-pump coronary artery bypass grafting compared with percutaneous coronary intervention: A propensity score analysis. *Eur J Cardiothorac Surg*. (in press)


 V

冠動脈疾患における治療学の進歩

Therapeutic Treatment with Sustained-Release Platelet-Rich Plasma Restores Blood Perfusion by Augmenting Ischemia-Induced Angiogenesis and Arteriogenesis in Diabetic Mice

Shyamal Chandra Bir^c Jiro Esaki^a Akira Marui^a Hisashi Sakaguchi^a
Christopher G. Kevil^c Tadashi Ikeda^a Masashi Komeda^a Yasuhiko Tabata^b
Ryuzo Sakata^a

^aDepartment of Cardiovascular Surgery, Graduate School of Medicine, and ^bDepartment of Biomaterials, Field of Tissue Engineering, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan;

^cDepartment of Pathology, LSU Health Sciences Center, Shreveport, La., USA

Key Words

Diabetes · Ischemia · Angiogenesis · Growth factors · Platelet-rich plasma

Abstract

Objective: The objective of this investigation was to establish the effectiveness of sustained-release platelet-rich plasma (PRP) on perfusion and neovascularization in diabetic murine hind limb ischemia. **Methods:** After surgery in streptozotocin-induced diabetic mice, the mice were randomly assigned to the following 4 experimental groups: control (C), 100 μ l of the sustained-release form of platelet-poor plasma (PPP), 100 μ l of the solution form of PRP (PRP-sol), and 100 μ l of the sustained-release form of PRP (PRP-sr). Endpoint evaluations were: blood perfusion by laser Doppler perfusion imaging (LDPI), vascular density by anti-vWF, and mature vessel density by anti-smooth muscle actin antibody. **Results:** This study demonstrated that a sustained release of PRP increases the perfusion of ischemic tissue as measured by LDPI (57 ± 12 ; 56 ± 9 ; 72 ± 7 , and 98 ± 4 for the C, PPP, PRP-sol, and PRP-sr groups, respectively; $p < 0.05$), capillary density (151 ± 16 ; 158 ± 12 ; 189 ± 39 , and 276 ± 39 for

groups C, PPP, PRP-sol, and PRP-sr, respectively; $p < 0.05$), and mature vessel density (28 ± 2 ; 31 ± 3 ; 52 ± 10 , and 85 ± 13 for the C, PPP, PRP-sol, and PRP-sr groups, respectively; $p < 0.05$). **Conclusion:** A sustained release of PRP containing potent angiogenic growth factors restores blood perfusion by stimulating angiogenesis and arteriogenesis.

Copyright © 2010 S. Karger AG, Basel

Introduction

Peripheral arterial disease (PAD) is a cardiovascular disorder whose prevalence is rising with the recent increase in the proportion of geriatric and diabetic populations around the world. Therapeutic angiogenesis remains an attractive treatment modality for PAD and chronic tissue ischemia. Numerous mediators, including growth factors, transcription factors, and signaling molecules have been reported to augment chronic ischemia-induced angiogenesis in animal models. However, clinical trials of single and the solution form of proangiogenic agents have little-to-no practical utility in patients with such a disorder [1]. Therefore, there remains a clear need

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2010 S. Karger AG, Basel
1018–1172/11/0483–0195\$38.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/jvr

Prof. Ryuzo Sakata
Department of Cardiovascular Surgery
Graduate School of Medicine, Kyoto University
54 Kawaharacho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507 (Japan)
Tel. +81 75 751 3780, Fax +81 75 751 3098, E-Mail sbir@lsuhsc.edu

for better interventions with which to induce therapeutic angiogenesis.

Neovascularization is now believed to occur via 3 possible mechanisms: the sprouting of preexisting resident endothelial cells (angiogenesis), maturation and enlargement of the preexisting small vessels through vascular remodeling (arteriogenesis), and the recruitment of bone marrow-derived endothelial progenitor cells (vasculogenesis). Among the above mentioned approaches, therapeutic angiogenesis with growth factors constitutes a potential alternative approach for patients with PAD and for improving the neovascularization of ischemic tissues [2]. The establishment of stable and functional blood vessel networks, however, is a complex process that requires several angiogenic factors to stimulate vessel sprouting and the remodeling of the primitive vascular network [3–5].

Furthermore, diabetes mellitus (DM) is one of the negative predictors of neovascularization. There is increasing evidence that all of the processes of neovascularization, such as angiogenesis, arteriogenesis, and vasculogenesis, are impaired in diabetic ischemia which demands more attention to the interplay between different growth factors as well as cells [6–10].

In relation to the above mentioned issues PRP, i.e. a limited volume of plasma rich in platelets, is attracting attention as a safe and cost-effective source of various growth factors [11, 12]. It also induces VEGF and HGF in culture [12]. By containing these various cytokines, PRP plays important roles in regenerating damaged tissue [13, 14]. However, little is known about the mechanism of the PRP-related regeneration of diabetic ischemic tissues.

A short shelf life and an inefficient delivery to target cells are major concerns associated with the local administration of recombinant human growth factors. The growth factor is expensive and many doses may be required to achieve any therapeutic effect, especially with the solution form. In light of these limitations, we have reported the efficacy of gelatin hydrogel microspheres as a carrier for the local, slow, and sustained delivery of different growth factors [9, 15, 16]. Furthermore, we have also reported that gelatin hydrogel is a promising carrier for the growth factors in PRP [11, 17].

The objective of this investigation was to characterize the angiogenic and growth factor content of diabetic PRP and to determine, *in vitro*, its effect on endothelial cell proliferation and capillary tube formation. Additionally, this experiment sought to determine the effectiveness of different compositions of PRP (solution vs. sustained release) on perfusion and neovascularization in a diabetic murine model of hind limb ischemia.

Methods

Experimental Animals

Six-week-old male C57BL/6 mice were purchased from Japan SLC (Shizuoka, Japan). The Kyoto University Animal Experiment Committee approved the experiment protocol. Animals were cared for in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council.

Generation of the Diabetic Model

Six-week-old male C57BL/6 mice were randomized to receive an intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ; 150 mg/kg/dose) dissolved in 1 M sodium citrate buffer, pH 4.5, or vehicle to generate the diabetic model. Two weeks after injection, the serum glucose level was measured using an Accu-Chek II Advantage Glucometer (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Mice with serum glucose levels ≥ 250 mg/dl were included in this study [9]. This blood sugar level (>250 mg/dl) was consistently maintained during the whole study period.

Preparation of PRP and Platelet-Poor Plasma (PPP)

Peripheral blood (10 ml) was collected from STZ-induced diabetic mice using an anticoagulant citrate-phosphate-dextrose solution. The collected blood was centrifuged at 2,400 rpm/20°C; the supernatant (plasma) including the buffy coat and content 0.5 ml below the buffy coat was decanted to the other tube and RBC and WBC were discarded. Secondary centrifugation was performed at 3,600 rpm/10 min/20°C. The clear supernatant (plasma) was decanted until 0.5 ml was left and the middle portion of the supernatant (plasma) was taken as PPP. Finally, the remaining supernatant including the buffy coat and content 0.5 ml below the buffy coat was taken as PRP and stored at -80°C for various evaluations. The quantification of platelets in PRP was done by Falco Laboratory, Kyoto, Japan [11].

Preparation of Gelatin Hydrogel Microspheres Containing PRP

PRP contains different cytokines but these cytokines, having a faster degradation, are effective for a very short time. Our previous studies have shown that when platelets in PRP are activated with gelatin molecules during the process of PRP impregnation, growth factors are released from the PRP. The growth factors secreted are immobilized in the hydrogel through physicochemical interaction with gelatin molecules. The immobilized growth factors are released from the hydrogel as a result of hydrogel degradation [17]. We have also developed a sustained-release form for the many growth factors and have shown that the sustained release of these growth factors incorporated in gelatin hydrogel microspheres effectively restores revascularization in different models of cardiovascular disease [9, 16]. Therefore, we used gelatin hydrogel as a carrier for the growth factors in the PRP.

Gelatin hydrogel microspheres incorporating PRP were prepared as described previously [9, 11, 16, 17]. Briefly, gelatin with an isoelectric point of 4.9 was isolated from bovine bone collagen by an alkaline process using $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Nitta Gelatin, Osaka, Japan). Gelatin microspheres were prepared through (1) the cross linking of gelatin in aqueous solution dispersed in an oil phase and (2) the cross linking of gelatin microspheres with glutaraldehyde. Microsphere diameter was measured for at least 100 micro-

spheres by viewing with a light microscope to calculate their volume. The average diameter of the freeze-dried microspheres was 26 μm .

PRP and PPP were incorporated into the gelatin microspheres by dropping 100 μl of PRP or 100 μl of PPP solution into 10 mg of freeze-dried gelatin microspheres, respectively, which were then left in an incubator for 1 h at 37°C temperature. The solution (100 μl) was completely absorbed into the microspheres during swelling since the solution volume was less than that theoretically required for the equilibrated swelling of microspheres. Upon use, the PRP containing gelatin hydrogel microspheres was dispersed in 100 μl of PBS, aspirated into a 1-ml syringe attached to a 27-gauge needle (Terumo, Tokyo, Japan), and applied via a single intramuscular injection to the ischemic site.

Measurement of Different Growth Factors Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

The concentrations of different growth factors such as stromal cell-derived factor 1- α (SDF-1 α), platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB), vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in PRP and PPP were quantified using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) methods (R&D Systems, USA). The analyses were then performed as instructed by the manufacturer. Briefly, samples and standards were added to 96 growth factor antibody-coated well plates. After incubation and the removal of unbound substances, a secondary antibody was added. This step was followed by a further washing and incubation with a substrate. The color reaction was stopped and optical density measured at the wavelength of 495 nm [11].

Endothelial Cell Proliferation Assay

Mouse MSS31 endothelial cells (MSS31 was a kind gift from Dr. Kenichi Yamahara MD, PhD, Osaka National Heart Center, Osaka, Japan) were cultured on α -MEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan). Cultures were maintained at 37°C, 5% CO₂, and 100% humidity.

The endothelial cell proliferation assay was performed as follows: endothelial cells were plated in human plasma fibronectin-coated 24-well culture plates at a density of 3×10^4 cells/well in α -MEM medium containing 10% FBS and cultured at 37°C. The next day, the medium was changed to α -MEM medium containing 0.5% FBS with or without PRP, and culture was continued for 3 days. Cells were detached with trypsin and counted using a hemocytometer [11, 18].

Tube Formation Assay

Growth factor reduced Matrigel (BD Biosciences) was used to coat the wells of 24-well plates (0.20 ml/well) and was left to polymerize at 37°C for 30 min. MSS31 endothelial cells suspended in α -MEM medium supplemented only with 0.5% FBS and antibiotics were added to each well after polymerization. Subsequently, PRP was added to the selected well and incubated for 6–8 h. The medium was removed and the cells were fixed with 4% paraformaldehyde. Photographs were taken through a microscope (Olympus, Tokyo, Japan). The capillary tube area was quantified per square micrometer using image analysis software (Image J Corporation) [11, 18].

Mouse Ischemic Hind Limb Model

Hind limb ischemia was created in the 6-week-old male wild-type mice as described previously [9, 11, 16]. Briefly, after the mice were anesthetized using intraperitoneal sodium pentobarbital (60 mg/kg), the entire right saphenous artery and vein, the right external iliac artery and vein, and the deep femoral and circumflex arteries and veins were ligated, cut, and excised to obtain a mouse model of severe hind limb ischemia as described previously.

After surgery, the mice were randomly assigned to 4 experimental groups (n = 10, each group) and treated for 4 weeks as follows: 10 mg gelatin hydrogel microspheres only (control group), sustained-release form of PPP (100 μl PPP/10 mg gelatin hydrogel microspheres, PPP group), 100 μl solution form of PRP (PRP-sol group), and sustained-release form of PRP (100 μl PRP/10 mg gelatin hydrogel microspheres, PRP-sr group). Treatments were applied by way of a single intramuscular injection to the ischemic site.

At 4 weeks after the initiation of treatment, the mice were re-anesthetized using an intraperitoneal injection of pentobarbital (60 mg/kg), subjected to the measurements described below, and then sacrificed with an overdose of pentobarbital for histological examination.

Measurement of Hind Limb Blood Perfusion

Hind limb blood perfusion was scanned using a laser Doppler perfusion image (LDPI) analyzer (Moor Instruments, Devon, UK) on the first day of treatment and then every 7 days throughout the whole study period. To eliminate the influence of the surgical procedure, the average blood perfusion of the bilateral feet was evaluated. To minimize influential variables including ambient light and temperature, perfusion was expressed as the ratio of the blood perfusion in the right (ischemic) limb to that in the left (nonischemic) limb of the same mouse, i.e. in terms of the LDPI index (LDPII) [9, 11, 16].

Immunohistological Analysis

The immunohistological study was conducted as described previously [9, 11, 16]. Briefly, the mice were euthanized and perfusion-fixed with 4% paraformaldehyde 4 weeks after the initiation of treatment. The ischemic calf muscles were embedded in OCT compound (Sakura Finetechnical, Tokyo, Japan) and frozen at -80°C. Cryostat sections (5- μm thick) of the tissues were stained with rabbit polyclonal anti-human von Willebrand factor (vWF) antibody or mouse monoclonal anti-human smooth muscle actin antibody. As the negative control, rabbit normal immunoglobulin fraction (Dako Japan, Kyoto, Japan) was used to show antibody specificity. From each mouse, 8 random fields on 2 different sections (approximately 3 mm apart) were photographed with a digital camera (Olympus). The number of vWF (endothelial marker)-positive or SMA (vascular smooth muscle marker)-positive vessels was counted manually in a blind fashion (vessels/mm²). Vascular density (angiogenesis) was determined by the counted number of vWF-positive vessels and mature vessel density (arteriogenesis) by the counted number of SMA-positive vessels.

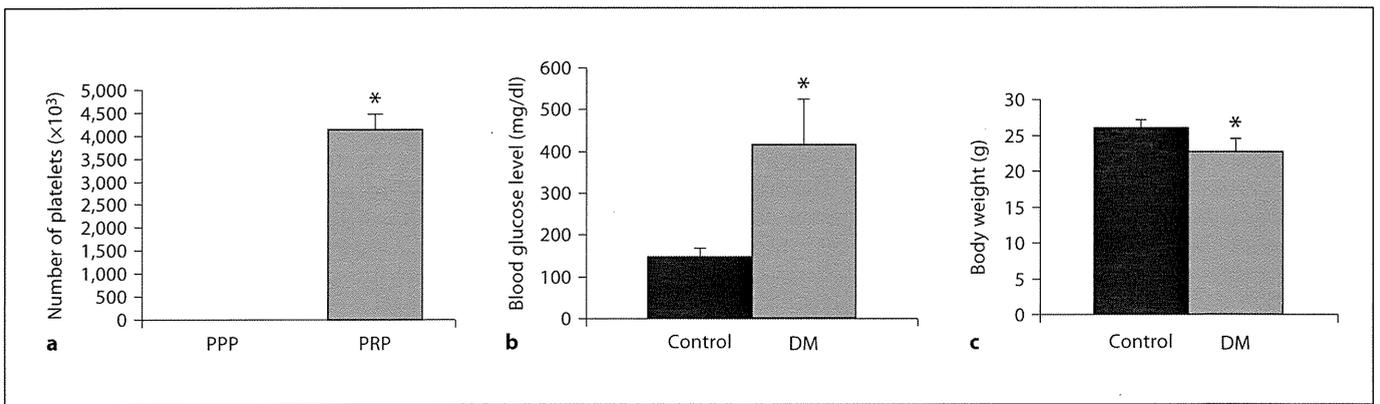


Fig. 1. PRP contains a large number of platelets in a small volume of plasma compared to PPP. **a** Concentration of platelets in PRP and PPP. * $p < 0.05$ vs. PPP group. **b** Blood glucose level in diabetic mice compared to non-diabetic mice. * $p < 0.05$ vs. control group (non DM). **c** Body weight of diabetic mice compared to nondiabetic mice. * $p < 0.05$ vs. control group (non DM).

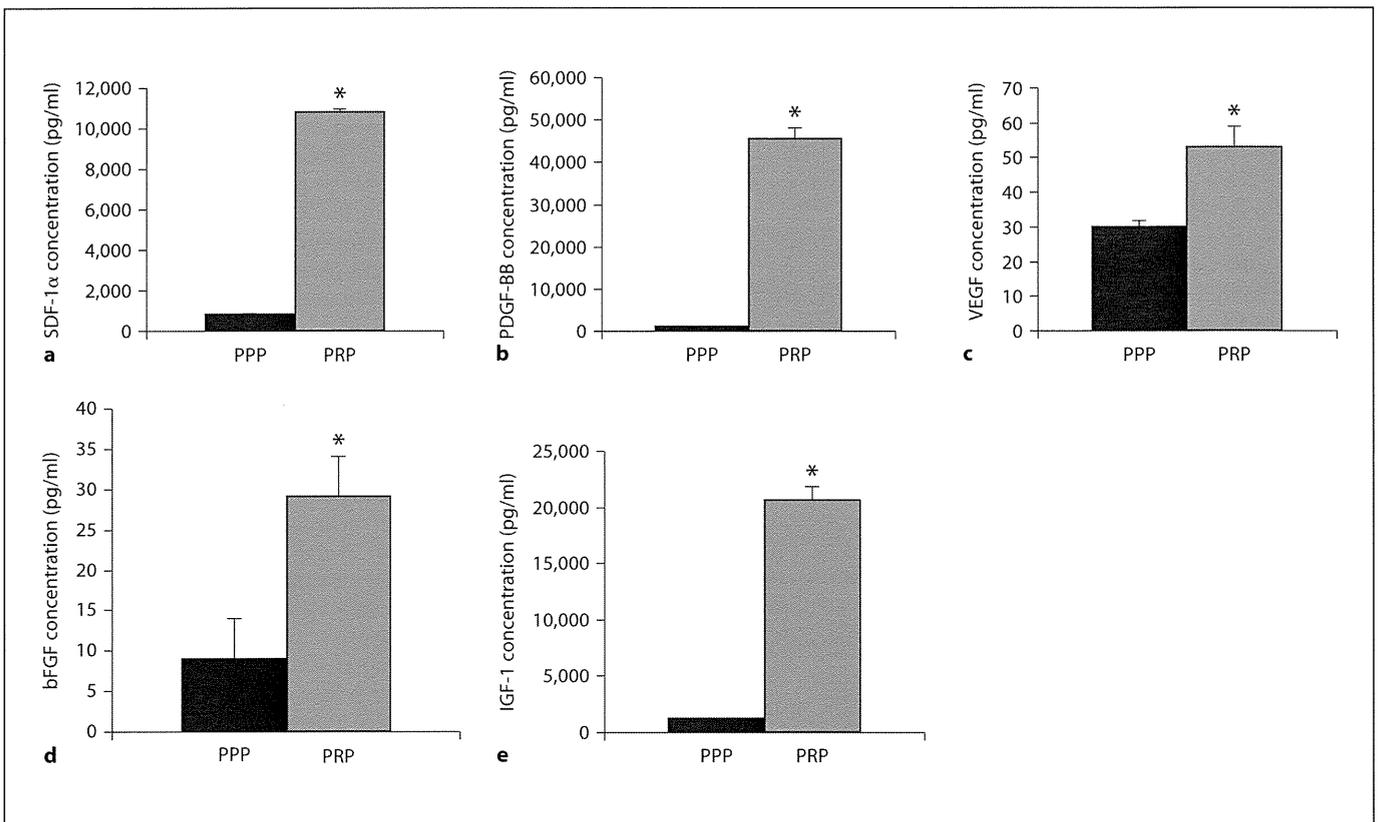


Fig. 2. Concentration of different growth factors in PPP and PRP. **a** SDF-1 α (n = 5). **b** PDGF-BB (n = 5). **c** VEGF (n = 5). **d** bFGF (n = 5). **e** IGF-1 (n = 5). * $p < 0.05$ vs. PPP group.

Results

Concentration of Platelets in PRP

Figure 1a shows the platelet concentration in PRP compared to PPP. The number of platelets was higher in the PRP group than that in the PPP group ($4,410 \pm 34 \times 10^3$ vs. $3.6 \pm 1.1 \times 10^3$, respectively; $p < 0.05$).

Blood Sugar Level and Body Weight Profile

Figure 1b, c shows the serum blood sugar level (mg/dl) and body weight (g) of the DM mice, respectively. The blood sugar level was higher in the DM group compared to the controls (non-DM) (414 ± 110 vs. 146 ± 23 for DM and control mice, respectively; $p < 0.05$). This blood sugar level (>250 mg/dl) was consistently maintained during the whole study period. In contrast, body weight in the DM mice was significantly lower than in the control mice (26 ± 1 vs. 23 ± 2 for DM mice and controls, respectively; $p < 0.05$).

Concentration of Different Growth Factors in PRP and PPP

Figure 2 shows the concentration of various growth factors. The concentration (pg/ml) of different growth factors was significantly higher in the PRP group than in the PPP group. The concentrations (pg/ml) of SDF-1 α ($10,790 \pm 196$ vs. 810 ± 39), PDGF-BB ($45,352 \pm 2,698$ vs. 958 ± 251), VEGF (53 ± 6 vs. 30 ± 2), bFGF (29 ± 5 vs. 9 ± 5), and IGF-1 ($20,628 \pm 1,180$ vs. $1,214 \pm 36$) were significantly higher in the PRP group than in the PPP group, respectively.

In vitro Endothelial Cell Proliferation Assay and Capillary Tube Formation Assay

Figure 3a shows the time course of endothelial cell proliferation by PRP. Endothelial cell proliferation was induced consistently with PRP from day 1 through day 3. At day 3, the numbers of endothelial cells was higher in the PRP group than in the control and PPP groups ($2.01 \pm 0.63 \times 10^4$; $2.1 \pm 0.19 \times 10^4$, and $7.95 \pm 0.64 \times 10^4$ for the control, PPP, and PRP groups, respectively; $p < 0.05$). Figure 3b, d shows the capillary tube formation by PRP. The capillary tube area (μm^2) was higher in the PRP group than in the controls ($88,567 \pm 9,871$ vs. $39,978 \pm 8,522$, respectively; $p < 0.05$).

Blood Perfusion

The time course of blood perfusion is depicted in figure 4. The LDPII in the PRP-sr group was significantly higher than in the other groups 4 weeks after treatment

(41 ± 18 ; 57 ± 14 ; 64 ± 12 , and 85 ± 13 for the control, PPP, PRP-sol, and PRP-sr groups, respectively; $p < 0.05$). No significant difference in LDPII was observed among the control, PPP, and PRP-sol groups.

Vascular Density

Vascular density (stained with anti-vWF antibody) and representative photomicrographs of histological sections are shown in figure 5a, b, respectively. Vascular density in the PRP-sr group was higher than in the other groups at 4 weeks after the initiation of treatment (141 ± 29 ; 131 ± 37 ; 143 ± 31 , and 291 ± 42 for the control, PPP, PRP-sol, and PRP-sr groups, respectively; $p < 0.05$). No significant difference in vascular density was observed among the control, PPP, and PRP-sol groups.

Mature Vessel Density

Mature vessel density (stained with anti-smooth muscle actin antibody) and representative photomicrographs of histological sections are shown in figure 6a, b. Mature vessel density in the PRP-sol and PRP-sr groups was higher than in the other groups at 4 weeks after the initiation of treatment (33 ± 17 ; 28 ± 11 ; 41 ± 13 , and 92 ± 12 for the control, PPP, PRP-sol, and PRP-sr groups, respectively; $p < 0.05$). Mature vessel density in the PRP-sr group was higher than that in the PRP-sol group. No significant difference in mature vessel density was observed between the control and PPP groups.

Discussion

Key Findings

To our knowledge, this is the first study looking at the effect of the sustained release form of PRP on endothelial cell proliferation and capillary tube formation in vitro and the augmentation of blood perfusion in STZ-induced diabetic mouse hind limb ischemia.

Clinically useful strategies for enhancing therapeutic angiogenesis have largely been unrealized. This is likely because stimulation of revascularization involves multiple complex events such as angiogenesis, arteriogenesis, and vasculogenesis. These mechanisms are tightly controlled by several growth factors that favor vessel growth. Single growth factor use has limitations to inducing optimal angiogenesis as such; the establishment of stable and functional blood vessel networks requires several angiogenic factors [1–5].

It has been reported that PRP is a storage vehicle for various growth factors such as PDGF, IGF-1, VEGF,

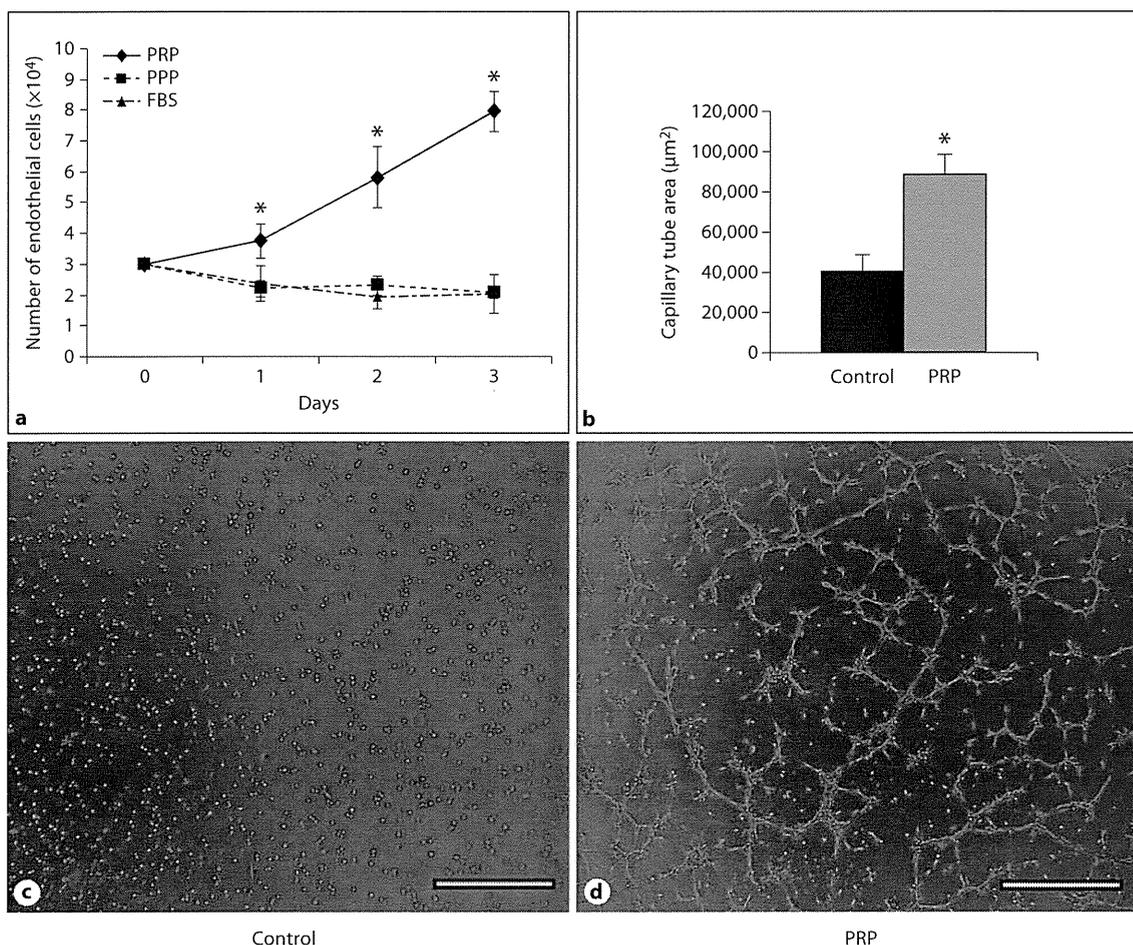


Fig. 3. PRP induces endothelial cell proliferation. **a** Time course of endothelial cell proliferation resulting from the control (FBS) 10 μ l, PPP 10 μ l, and PRP (10 μ l). **b** Capillary tube area formed by the control and PRP, $n = 3$ in each group. **c, d** Photomicrographs of the capillary tube formed by the control (FBS) and PRP. Scale bars = 100 μ m. * $p < 0.05$ vs. control group.

bFGF, and TGF- β , among others [11, 12]. We measured different growth factors in the PRP of STZ-induced diabetic mice and found that PRP contains relatively large amounts of SDF-1 α , PDGF-BB, and IGF-1, as well as small amounts of VEGF and bFGF, compared to PPP (fig. 2); this correlates with our previous study [11]. PRP containing angiogenic growth factors affects angiogenesis as well as wound healing [12, 18]. Platelet-derived microparticles stimulate the proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells in vitro [19]. Our findings have shown that the PRP of STZ-induced diabetic mice is capable of stimulating the proliferation of endothelial cells and can also produce an endothelial capillary tube. We reasoned, therefore, that PRP may represent therapeutic intervention that stimulates ischemic

angiogenesis with a high efficacy by virtue of providing various potential angiogenic growth factors in mouse hind limb ischemia.

It has been recognized that platelets in PRP secrete various growth factors during the degranulation of α granules and that the secreted factors exhibit various biologic activities. It is well known that collagen and thrombin trigger platelet aggregation and the subsequent secretion of platelet growth factors [17]. Gelatin, a derivative of collagen, can also trigger platelet activation for growth factor secretion which is similar to that of thrombin [14, 17]. Our previous studies have shown that when platelets in PRP are activated with gelatin molecules during the process of PRP impregnation, growth factors are released from the PRP. The growth factors secreted are immobi-