

磁気共鳴法による心筋微小循環障害へのアプローチ

分担研究者 後藤 葉一 国立循環器病センター心臓血管内科医長

研究要旨

成人心疾患領域において、シンドロームX、たこつぼ心筋障害、急性心筋梗塞再灌流障害などの病態に心筋微小循環障害が関与すると考えられた。これらの病態の機序の解明のために、心筋微小血管造影法の臨床応用が望まれる。

A. 研究目的

現在、冠動脈疾患の標準的診断法として用いられている冠動脈造影法は、径 200 μ m 以上の冠動脈しか評価できないとされる。この冠動脈造影法による評価では心表面の径 200 μ m 以上の太い冠動脈には狭窄病変が無く、心筋内の径 200 μ m 以下の細い冠動脈に何らかの異常が存在すると想定されている成人の心疾患があるが、その臨床像や病態の詳細は不明である。本研究では、心筋微小循環障害が病因や病態に関与すると想定され、今後心筋微小血管造影の応用を必要とする成人心疾患の臨床像について検討するとともに、臨床的冠微小循環障害評価法として冠動脈造影以外に磁気共鳴法(MRI)およびホジトロン断層撮影法(PET)による評価を検討した。

B. 研究方法

国立循環器病センターに入院した心疾患患者において、冠動脈微小循環障害が想定される疾患の臨床像を検討した。特にたこつぼ心筋症と呼ばれる病態において MRI による遅延造影像とアンモニア(NH₃)-PET による冠血流予備能を検討した。

(倫理面への配慮)

個人情報保護に十分配慮し、個人を特定できる臨床情報を同意なく公表あるいは施設外へ提供しない。

C. 研究結果

成人心疾患領域において、冠微小循環障害が関与すると考えられる病態として、1) シンドロームX(microvascular angina)、2) たこつぼ心筋障害、3)急性心筋梗塞再灌流療法後の心筋灌流障害と慢性期の左室リモデリング、4)肥大心における心内膜下心筋虚血、5)冠側副血行路依存の心筋灌流、6)一部の虚血性心筋症、糖尿病性心筋症などが挙げられる。

シンドロームXは、狭心症様胸痛および運動負荷心電図でのST低下を示すが、冠動脈造影が正常であり、それに加えて運動負荷中の冠静脈洞採血で乳酸産生が示されること、冠血流予備能が低下していることから、発症機序として微小冠動脈の攣縮(microvascular spasm)が提唱されているものの、いまだ未確定である。

たこつぼ心筋障害は、急性心筋梗塞を思わせる突然の胸痛、心電図で急性期の心筋

梗塞様の ST 上昇と慢性期の巨大陰性 T 波、左室心尖部の「たこつぼ」様の収縮低下といった急性冠症候群に類似した特徴を有するが、冠動脈造影が正常であることから、病態に冠微小循環異常が関与していると想定されているが、発症機序は依然として不明である。

急性心筋梗塞において、冠動脈インターベンション治療により太い冠動脈の閉塞が解除されているにもかかわらず、心筋内への灌流が得られない例があり、そのような症例では慢性期に左室機能低下をきたす率が高い(no reflow 現象)。この機序として、冠動脈微小血栓、白血球塞栓、微小血管内皮浮腫などによる心筋微小循環障害が想定されている。

今回我々は、冠動脈造影にて太い冠動脈に狭窄病変を認めずエルゴノピン負荷による冠攣縮誘発試験が陰性であったたこつぼ心筋障害患者において、ジピリダモール負荷 NH₃-PET を実施したところ、冠血流予備能が 1.6~1.8 と正常に比べ大きく低下していることを見出した。また磁気共鳴法 (MRI) では、心筋梗塞とは異なり遅延造影所見は認められず、早期造影所見が認められた。以上より、冠微小循環の機能異常の存在が示唆された。

D. 考察

成人心疾患において、冠微小循環障害が関与すると考えられる病態が少なからず存在する。しかしいずれの病態においても、現時点で冠微小循環の異常を直接証明する臨床的方法がないために、原因は依然として不明である。今後病因・病態の解明に心筋微小血管造影の応用が必要と考えられる。

E. 結論

成人心疾患において、心筋微小循環造影法の臨床応用を必要とする病態が少なからず存在する。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

該当なし。

1. 論文発表

別紙 4 刊行物一覧表参照

2. 学会発表

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

梗塞様の ST 上昇と慢性期の巨大陰性 T 波、左室心尖部の「たこつぼ」様の収縮低下といった急性冠症候群に類似した特徴を有するが、冠動脈造影が正常であることから、病態に冠微小循環異常が関与していると想定されているが、発症機序は依然として不明である。

急性心筋梗塞において、冠動脈インターベンション治療により太い冠動脈の閉塞が解除されているにもかかわらず、心筋内への灌流が得られない例があり、そのような症例では慢性期に左室機能低下をきたす率が高い(no reflow 現象)。この機序として、冠動脈微小血栓、白血球塞栓、微小血管内皮浮腫などによる心筋微小循環障害が想定されている。

今回我々は、冠動脈造影にて太い冠動脈に狭窄病変を認めずエルゴノビン負荷による冠攣縮誘発試験が陰性であったたこつぼ心筋障害患者において、ジピリダモール負荷 NH₃-PET を実施したところ、冠血流予備能が 1.6~1.8 と正常に比べ大きく低下していることを見出した。また磁気共鳴法(MRI)では、心筋梗塞とは異なり遅延造影所見は認められず、早期造影所見が認められた。以上より、冠微小循環の機能異常の存在が示唆された。

D. 考察

成人心疾患において、冠微小循環障害が関与すると考えられる病態が少なからず存在する。しかしいずれの病態においても、現時点で冠微小循環の異常を直接証明する臨床的方法がないために、原因は依然として不明である。今後病因・病態の解明に心筋微小血管造影の応用が必要と考えられる。

E. 結論

成人心疾患において、心筋微小循環造影法の臨床応用を必要とする病態が少なからず存在する。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

該当なし。

1. 論文発表

該当なし。

2. 学会発表

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

脳再生血管の可視化

分担研究者 田口 明彦 国立循環器病センター研究所 循環動態機能部室長

糖尿病は心筋の微小循環障害だけでなく、脳循環を含む全身のあらゆる臓器の微小循環障害を惹起する。我々は脳梗塞後の血管再生が神経機能再生を促進することを明らかにしてきたが、本研究においては、それらの脳再生血管の厳密な評価のための可視化を目的とした研究を行った。

A. 研究目的

糖尿病に起因する脳微小循環障害は脳血管性痴呆症などとの関連が示唆されているが、脳微小循環を適切に評価する撮像装置がないため、形態学的な脳微小循環障害の診断は臨床的に非常に困難である。また、我々はマウス脳梗塞モデルに対する骨髄単核球移植が、脳微小循環の再生を介して、神経細胞再生および神経機能の回復を促進することを示してきたが、定量的かつ3次元的な再生微小循環の評価が困難であった。以上のような現状を背景に、本研究では脳微小循環障害の可視化を目的とした研究を行った。

B. 研究方法

①脳微小循環障害評価に最適な造影剤の検討

通常の血管造影で使用されるヨード造影剤は溶液であり固定標本では血管外に流出する可能性があるため、厳密な3次元的な再生微小循環の評価には不適合であると考えた。そのため、ヨードを含有した microsphere、および消化管造影検査に用い

られるバリウム、さらにフィルターを用いて精製したバリウムを用いて、最適な造影剤の検討を行った。

②脳梗塞後の骨髄単核球移植による血管再生

我々が開発した SCID マウス脳梗塞モデルにおいて、脳梗塞 48 時間後に経静脈的に骨髄単核球移植を行った。このモデルは脳梗塞のサイズが一定しているだけでなく、虚血部位において安定的に血管が再生されるという特徴を有している。

③脳標本の作製

脳梗塞作成 9 日後にジエチルエーテル吸入で安楽死を行い、直ちに両側頸動脈よりカテーテルでカニューレーションした後、造影剤注入およびホルマリン固定を行った。

④プラズマ X 線を用いた撮像

造影剤注入標本における脳再生血管に関してプラズマ X 線を用いて、その空間・濃度分解能の検討を行った。さらに、そのための予備実験として同一サンプルを SPring-8(放射光)より得られた放射光を用いて解析を行った。

C. 研究結果

①最適造影剤の決定

ヨード含有 microsphere の粒子径は 15 μm であるものの、動注時にカテーテル内で microsphere 粒子が凝集することがあり、脳血管全体を 3 次元的に評価するには不適當であった。また、バリウム溶液の粘稠度はヨード造影剤溶液と比較して高く標本作製時に血管外に流出する可能性は低いと考えられたが、粒度分布が 1~200 μm であり原液で動注すると大きいバリウム粒子で動脈が塞栓され、目的とする血管が描出されなかった。そのため、5 μm の filter で濾過したバリウム溶液を作成し、両側内頸動脈より注入を行った。その結果、0.7ml の動注で、静脈側に流出することなくほぼ動脈側のみで充填されることを明らかにした。

②放射光を用いた再生血管の評価

正常血管解剖として、脳表に分布する動脈から脳灰白質を栄養する Perforator が明瞭に描出された。マウス脳表動脈径は約 100 μm で、約 70 μm の間隔を置いて規則正しく Perforator は脳表動脈とほぼ直行するように分枝しており、その径は約 15-20 μm 程度であった。コントロール群で脳梗塞を来した大脳半球を撮影すると、対側の大脳半球と比較して脳実質の萎縮が目立ち、梗塞巣周囲では脳表動脈は描出されるものの Perforator は消失していた。骨髄単核球投与群では脳実質の萎縮はあまり認められず、Perforator は対側の梗塞を来していない大脳半球のそれと比較してやや拡張や蛇行を認めるが、先述した正常血管解剖を参照して詳細に検討すると、治療群では移植によって本来の Perforator が残存していると考えられた。また、梗塞巣周囲で正常ではあ

まり血管が存在しない分水嶺や脳室周囲深部白質に Perforator よりも微細な血管が増生しており、移植により誘導された再生血管と考えられた。よってこれら再生血管が梗塞巣への側副路となり、梗塞巣へ必要な血液を供給したと示唆された。

③プラズマ X 線を用いた再生血管の評価

放射光で撮影した標本を用いて、プラズマ X 線の空間・濃度分解能を検討した。Perforator は描出されるが、詳細な血管形態を評価するに足る空間分解能は有していなかった。しかし径 70-100 μm 程度の脳表動脈は明瞭に描出されており、通常の血管造影装置よりも非常に高い分解能を有していると考えられた。さらに、プラズマ X 線撮影範囲が約 20cm 四方と大きく、一回の撮影で十分広範囲が撮影可能であり、臨床レベルでの評価も可能である特徴を有している。

D. 考察

本年度は、脳再生血管の評価に最適なモデル系の確立を行うと共に、放射光(Spring8)との対比を通じて、現在のプラズマ X 線の改良すべき点を明らかにした。さらに今年度の研究では、Perforator の正常解剖及び脳梗塞後の脳微小循環の形態変化を明らかにすると共に、心臓だけでなく脳循環に対する血管再生療法の可能性を示した。

E. 結論

今後は、動画血管撮影による再生血管および側副路からの血行動態の把握、さらに霊長類脳梗塞モデルにおける微小循環の評価を予定しており、これらの知見は病院設置型装置の開発に大きく寄与するものと考え

ている。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

[シンポジウム・講演]

1. 田口 明彦：脳血管障害に対する普遍的な再生医療の確立、Brain & Heart Attack Forum、2005.04.16
2. 田口 明彦：脳血管障害に対する再生医療の実現に向けて、第2回 血液細胞療法フォーラム、2005.07.17
3. 田口 明彦：脳血管障害に対する再生医療の実現に向けて、厚生労働科学研究推進事業：一般向け講演会－ここまでの心臓と血管を蘇らせる再生医療－、2005.09.12
4. 田口 明彦：脳血管障害におけるCD34陽性細胞測定の意義、第1回脳血管障害の病態・治療研究会、2005.11.09
5. 田口 明彦：脳血管障害に対する再生医療の実現に向けて、第21回日本脳神経血管内治療学会総会、2005.11.9
6. 田口 明彦：
脳血管障害に対する再生医療の実現に向けて、厚生労働科学研究推進事業：一般向け講演会－どうすれば脳・血管は若返るか－、2005.11.18
7. 田口 明彦：循環器領域における血管再生療法－Buerger 病から心臓、脳梗塞まで－、茨城県医療講演会、2005.12.03
8. 田口 明彦：脳血管障害に対する再生医療の実現に向けて、北海道大学工学部第2回生物機能高分子セミナー、2005.12.20

[著作]

Burger 病専門誌(改訂版)

－バージャー病治療と看護総覧－

監修：田口 明彦

H. 知的財産の申請

松山知弘、田口明彦、芳川浩男

神経幹細胞の調整法

国際出願番号：PCT/JP2006/302350

再生医療技術の開発

分担研究者 福山 直人 東海大学 講師

研究要旨：本研究における分担研究者の役割は、微小血管造影の開発に伴う微小血管障害の可視化における実際の動物実験モデル作成及び新たな再生医療技術の開発である。本年度は微小血管造影装置開発に伴うファントムの作成を行うだけでなく、特に糖尿病患者に多く認められる末梢性動脈疾患の中でも（閉塞性動脈硬化症）に焦点を当て、その動物実験モデルを作成し、今回新たに開発中である微小血管撮影造影装置が現存する血管造影装置より血管新生を証明するために有用であることを明らかにし、来年度に向けての新たな再生医療技術の応用に向けて礎となる研究を行った。

A. 研究目的

本研究課題は、通常の血管造影では撮影することのできない微小血管を造影しうる新たな微小血管造影装置を開発することである。そのため、分担研究者は現在開発中である微小血管造影装置が有用であることを示すため、ファントムの撮影を行うための動物実験モデルを作成した。また、糖尿病のような血管障害を発生する疾患で大きな問題となる閉塞性動脈硬化症モデルを利用し、その微小血管障害の描出に、今回新たに開発された微小血管造影装置が有用であることを明らかにし、来年度に向けての新たな再生医療技術の応用に向けての礎となる研究を行った。

B. 研究方法

ファントムの作成に関しては、ネブタールを用いた全身麻酔下で犬の冠動脈や脳血管に対してカテーテルを用いて選択的にマイクロスフェアを充てんすることにより作製を行った。

閉塞性動脈硬化症モデルの作製は、フォーレンを用いた全身吸入麻酔下においてマウスの大腿動脈を結紮切離するモデルを利用し、微小血管描出の評価を行った。また既に我々は、閉塞性動脈硬化症における血管新生に iNOS が関与していることを明らかにしており、iNOS が関与する微小血管新生についても併せて評

価を行った。

（倫理面への配慮）

1. 動物実験に関しては、東海大学医学部の動物実験規定に従い研究を遂行した。
2. 遺伝子組み換え生物や遺伝子の使用による研究に関しては、東海大学医学部の動物実験委員会および倫理委員会の承諾のもと研究を遂行した。

C. 研究結果

作成したファントムは、国立循環器病センターに搬送し、代表研究者や他の分担研究者らにより開発中の微小血管造影装置が 20 μm 程度の微小血管を造影することができることが明らかとなった。

閉塞性動脈硬化症モデルを用いた検討においては、従来の血管造影法では新たに新生する微小血管を造影することはできなかったが、本研究で開発中の微小血管造影装置を用いることにより、新生血管をはっきりと描出することができることが明らかとなった。FITC ゲルを用いた微小血管造影と比較検討も行ったが、本研究で開発中の微小血管造影装置による描出は有意差をもって優れていた。本検討の中で iNOS 遺伝子による閉塞性動脈硬化症における血管新生の抑制が明らかとなったが、この知見は、従来の血管造影法では、見いだすことはできなかった。

D. 考察

本検討において、動物モデルを用いた検討においては、順調に微小血管造影装置の開発は進んでいると考えられた。現在本研究において血管内皮前駆細胞やアドレノメデュリンを用いた血管再生医療と検討が行われているが、本年度の研究により iNOS 遺伝子をターゲットとした新たな血管新生療法や抗血管新生療法の開発の可能性が示され、来年度以降新たな解析を行う必要があると考えられた。

E. 結論

順調に新たな微小血管造影装置の開発が進んでおり、実験動物レベルでは既存の血管造影法に比較し、有意な微小血管の撮影を行うことが可能であることが示唆された。しかしながら、次年度においては、血管に富む臓器の描出などのほか視野やより小さい血管の描出など改善する必要があると思われた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kimura K, Shinozaki Y, Hui S, Shizuma T, Fukuyama N, Nakazawa H, Triiodothyronine acutely increases blood flow in the ventricles and kidneys of anesthetized rabbits. *Thyroid* (in press)
2. Koji Kimura, Takako Goto, Kentarou Yagi, Hidekazu Furuya, Shio Jujo, Johbu Itoh, Sadaaki Sawamura, Shirotsaku Koide, Hidezo Mori, Naoto Fukuyama, Biphasic of inducible nitric oxide synthase in a hind limb ischemia model, *J.Clin.Biochem.Nutr*, 2005, Vol38:2:1-4
3. Khurelbaatar N, N.Fukuyama, H.Nakazawa. Results of screening with liver cancer patients for the hepatitis B and C viral markers. *J Health Science UB*, 1 111-114, 2005
4. Chen, Y. Hozawa, S. Sawamura, S. Sato, S. Fukuyama, N. Tsuji, C. Mine, T. Okada, Y.

Tanino, R. Ogushi, Y. Nakazawa, H. Deficiency of inducible nitric oxide synthase exacerbates hepatic fibrosis in mice fed high-fat diet.

Biochem Biophys Res Commun. 2005 Jan ; 326 (1) : 45-51.

5. Hayashi Y, Sawa Y, Nishimura M, Fukuyama N, Ichikawa H, Ohtake S, Nakazawa H, Matsuda H. Peroxynitrite, a product between nitric oxide and superoxide anion, plays a cytotoxic role in the development of post-bypass systemic inflammatory response. *EUROPEAN JOURNAL OF CARDIO-THORACIC SURGERY* 26 (2): 276-280 AUG 2004

2. 学会発表

なし

H. 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

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表

【書籍】

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Nishigami K., Nakatani T., Chiku M., Mori H.	A novel micro-angiography detecting angiogenesis, Application for autologous bone marrow mononuclear cells transplantation in the patients with	Mori H., Matsuda H.	Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches	Springer	Tokyo	2005	191-199
知久正明、 西上和宏、 内藤博昭、 盛 英三、 佐藤英一	画像解析-微小血管造影-	田畑泰彦	遺伝子医学MOOK 1再生医療へのブレイクスルー(その革新技术と今後の方向性)	メディカルドゥ		2005	223-227
田口明彦	自己幹細胞移植による血管再生療法	田口明彦	Burger病専門誌バージャー病治療と看護総	茨城県バージャー病患者と家族の会	東京都	2005	24-28
田口明彦	その他の新しい治療法：炭酸浴療法による血流改善	田口明彦	Burger病専門誌バージャー病治療と看護総	茨城県バージャー病患者と家族の会	東京都	2005	29-31

別紙4
研究成果の刊行に関する一覧表
【雑誌】

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Sato, E., Germer, R., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Ichimaru, T., Sato, S., Ojima, H., Takayama, K., Ido, H	Quasi-monochromatic cerium flash angiography.	SPIE	5580	146-152	2005
Sato, E., Germer, R., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Ichimaru, T., Sato, S., Ojima, H., Takayama, K., Ido, H.	Weakly ionized linear plasma x-ray generator with molybdenum-target tride.	SPIE	5580	535-542	2005
Sato, E., Sagae, M., Komatsu, M., Germer, R., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Ichimaru, T., Sato, S., Ojima, H., Takayama, K., Ido, H.:	Monochromatic flash x-ray generator utilizing copper-target diode.	SPIE	5580	579-585	2005
Sagae, M., Sato, E., Obara, H., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Sato, S., Ojima, H., Takayama, K., Ido, H.	Intense quasi-monochromatic flash x-ray generator utilizing molybdenum-target diode.	SPIE	5580	674-680	2005
Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Sato, S., Ojima, H., Takayama, K., Ido, H	Energy selective high-speed radiography utilizing stroboscopic x-ray generator.	SPIE	5580	765-771	2005
Sato, E., Sagae, M., Obara, H., Germer, R., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Ichimaru, T., Sato, S., Ojima, H., Takayama, K., Ido, H	Demonstration of flash K-edge angiography utilizing gadolinium-based contrast medium.	SPIE	5580	817-823	2005
Obara, H., Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Ichimaru, T., Sato, S., Ojima, H., Takayama, K., Ido, H.	Superposition of x-ray spectra using a double-target plasma tube.	SPIE	5580	824-831	2005
Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Ichimaru, T., Sato, S., Takayama, K., Ido, H.	Compact monochromatic flash x-ray generator utilizing a disk-cathode molybdenum tube.	Med. Phys.	32	49-54	2005
Sagae, M., Sato, E., Tanaka, E., Hayasi, Y., Mori, H., Kawai, T., Ichimaru, T., Sato, S., Takayama, K., Ido, H.	Quasi-monochromatic X-ray generator utilizing graphite cathode diode with transmission-type molybdenum target.	Jpn. J. Appl. Phys.	44	446-449	2005
Hattan, N., Kawaguchi, H., Ando, K., Kuwabara, E., Fujita, J., Murata, M., Suematsu, M., Mori, Yada, T., Shimokawa, H., Hiramatsu, O., Kajita, T., Shigeto, F., Tanaka, E., Shinozaki, Y., Mori, H., Kiyooka, T., Katsura, M., Ohkuma, S., Masami, Goto,	Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in	Cardiovasc. Res.	65	334-344	2005
Fujii, T., Nagaya, N., Iwase, T., Murakami, S., Miyahara, Y., Nishigami, K., Ishibashi-Ueda, H., Shirai, M., Itoh, T., Ishino, K., Sano, S., Kangawa, K., Mori, H.	Beneficial effect of hydroxyfasudil, a specific Rho-kinase inhibitor, on ischemia-reperfusion injury in canine coronary microcirculation in vivo.	JACC	45	599-607	2005
Fujii, T., Nagaya, N., Iwase, T., Murakami, S., Miyahara, Y., Nishigami, K., Ishibashi-Ueda, H., Shirai, M., Itoh, T., Ishino, K., Sano, S., Kangawa, K., Mori, H.	Adrenomedullin enhances therapeutic potency of bone marrow transplantation for myocardial infarction in rats.	Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.	288	H1444 - H1450	2005
Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Takayama, K., Ido, H.	High-speed K-edge angiography achieved with tantalum K-series characteristic x rays.	SPIE	5745	810-817	2005
Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Sato, S., Takayama, K.	High-speed enhanced K-edge angiography utilizing cerium plasma x-	Opt.Eng.	44	049001(1-6)	2005
Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Sato, S., Takayama, K.	Clean monochromatic x-ray irradiation from weakly ionized linear copper	Opt.Eng.	44	049002(1-6)	2005
Kawada, T., Yamazaki, T., Akiyama, T., Shishido, T., Mori, H., Sugimachi, M.	Myocardial interstitial choline and glutamate levels during acute myocardial ischemia and local ouabain	Acta.Physiol. Scand.	184	187-193	2005

Hirata, A., Minamino, T., Asanuma, H., Sanada, S., Fujita, M., Tsukamoto, O.	Erythropoietin just before reperfusion reduces lethal arrhythmias and infarct size via phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway in canine hearts.	Cardiovasc.Drug s.Ther.	19	33-40	2005
Kitagawa, H., Yamazaki, T., Akiyama, T., Sugimachi, M., Sunagawa, K., Mori, H.	Microdialysis separately monitors myocardial interstitial myoglobin during ischemic and reperfusion.	Am.J.Physiol.He art.Circ.Physiol.	289	H924-H930	2005
Nagaya, N., Kangawa, K., Itoh, T., Iwase, T., Murakami, S., Miyahara, Y., Fujii, T., Uematsu, M., Ohgushi, H., Yamagishi, M., Tokudome, T., Mori, H.,	Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy.	Circulation	112	1128-1135	2005
Kuroko, Y., Fujii, T., Yamazaki, T., Akiyama, T., Ishino, K., Sano, S., Mori H.	Contribution of catechol O-methyltransferase to the removal of accumulated interstitial catecholamines evoked by myocardial ischemia.	Neuroscience Letters,	388	61-64	2005
Ben Ammar, Y., Takeda, S., Sugawara, M., Miyano, M., Mori, H., Wakabayashi, S.	Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the human calcineurin homologous protein CHP2 bound to the cytoplasmic region of the Na ⁺ /H ⁺ exchanger NHE1. Acta Cryst.	Acta Cryst	Section F Structural Biology and Crystallization Communications	956-958	2005
Sato, E., Yamadera, A., Ichimaru, T., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Takayama, K.	Conventional Enhanced K-edge angiography Utilizing cerium x-ray generator.	原子核研究	49	69-74	2005
Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Takayama, K., Ido, H.	Preliminary experiment for producing higher harmonic x rays utilizing copper plasma triode.	原子核研究	49	61-67	2005
Ichimaru, T., Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Sato, S., Takayama, K.	Quasi-monochromatic fine polycapillary imaging utilizing a computed radiography system.	Bull.Health, Sci. Hirosaki,	4	83-91	2005
Ichimaru, T., Yamadera, A., Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Sato, S., Takayama, K.	Cone-beam K-edge angiography utilizing cerium x-ray tube in conjunction with cerium oxide filter.	Bull.Health, Sci. Hirosaki	4	93-100	2005
Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Ito, F., Takayama, K., Onagawa, J., Ido, H.	Variations in cerium x-ray spectra and enhanced K-edge angiography.	Jpn.J.Appl.Phys.	44	8204-8209	2005
Sato, E., Hayasi, Y., Kimura, K., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Takayama, K., Onagawa, J., Ido, H.	Enhanced K-edge angiography utilizing tantalum plasma x-ray generator in conjunction with gadolinium-based contrast media.	Jpn.J.Appl.Phys	44	8716-8721	2005
Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawakami, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Ichimaru, T., Takayama, K., Ido, H.	Enhanced magnification angiography including phase-contrast effect using a 100-um focus x-ray tube.	SPIE	5918	591811;1-9	2005
Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Ichimaru, T., Takayama, K., Ido, H.	Monochromatic x-ray generator utilizing angle dependence of bremsstrahlung x-ray distribution.	SPIE	5918	591819;1-7	2005
Sato, E., Hayasi, Y., Germer, R., Kimura, K., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Takayama, K., Ido H.	Energy-selective gadolinium angiography utilizing a stroboscopic x-ray generator.	SPIE	5920	59200V;1-8	2005
Sato, E., Hayasi, Y., Germer, R., Obara, H., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Takayama, K., Ido, H.	Preliminary study for producing higher harmonic hard x-rays from weakly ionized copper plasma.	SPIE	5920	59200U;1-7	2005
Obara, H., Sato, E., Hayasi, Y., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Takayama, K., Ido, H.	Superposition of x-ray spectra using a brass-target plasma triode.	SPIE	5920	59200W;1-8	2005

Sato, E., Hayasi, Y., Germer, R., Kimura, K., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Takayama, K., Ido, H.	Enhanced K-edge plasma angiography achieved with tungsten Karays utilizing gadolinium-based contrast media.	SPIE	5920	592012;1-8	2005
Sato, E., Hayashi, Y., Germer, R., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Ichimaru, T., Takayama, K., Onagawa, J., Ido, H.	Monochromatic flash x-ray generator utilizing a disk-cathode silver tube.	Opt.Eng.	44	096501(1-6)	2005
Sato, E., Yamadera, A., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Ito, F., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Takayama, K., Onagawa, J., Ido,	X-ray spectra from cerium target and their application to cone beam K-edge angiography.	Opt.Eng.	44	096502(1-6)	2005
Schwenke, D.O., Pearson, J.T., Tsuchimochi, H., Mori, H., Shirai, M.	Exogenous nitric oxide centrally enhances pulmonary reactivity in the normal and hypertensive rat.	Clinical and experimental pharmacology and physiology	32	952-959	2005
Sato, E., Tanaka, T., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Takahashi, K., Sato, S., Takayama, K.	X-ray spectra from characteristic x-ray generator with a molybdenum tube.	Annual Report of Iwate Medical University, School of Liberal Arts and	40	1-7	2005
Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Takahashi, K., Sato, S., Takayama, K.	Measurement of cerium x-ray spectra using a cerium oxide powder filter and enhanced K-edge angiography.	Annual Report of Iwate Medical University, School of Liberal Arts and	40	9-15	2005
Nagaya, N., Mori, H., Murakami, S., Kangawa, K., Kitamura, S.	Adrenomedullin: angiogenesis and gene therapy. (Invited Review)	Am.J.Physiol.Regul.Integr.Comp. Physiol.	288	R1432-R1437	2005
佐藤英一、林 保臣、小原春雄、田中越郎、盛 英三、河合敏昭、井上 敬、小川 彰、佐藤成大、市丸俊夫、高山和喜、白杵辰巳、佐藤公悦	シンクロトロンにかかわる医用単色X線装置の開発と応用。	医学物理	25	25-38	2005
宮原義典、盛英三、永谷憲歳	特集Ⅱ 第68回日本循環器学会学術集会2. 日本型移植医療をどう作るかー細胞・組織・臓器 心血管疾患における細胞ー遺伝子ハイブリッド治療。	循環器専門医	13	33-39	2005
E.Sato, Y. Hayasi, R. Germer, H. Ojima and K. Takayama	irradiatin of orderly multiline spectra from linear plasma formed by acuum discharge capillary.	SPIE	5580	765-771	2005
竹下聡	血管新生療法	治療学	39	775-777	2005
Tomita H, Echigo S et al	Late distortion of the original Palmaz stent implanted in postoperative lesions associated with congenital heart	Catheter Cardiovasc Interv.	65(2)	301-5	2005
Kitano M, Echigo S et al	Steep stent's angle to the reference vessel promotes neointima.	Congenital Cardiology		1-5	2005
Yasuda K, Echigo S et al	Dilated cardiomyopathy after pacemaker implantation in complete	Pediatr Int	47	121-125	2005
Kajimoto K, Shioji K, Ishida C, Iwanaga Y, Kokubo Y, Tomoike H, Miyazaki S, Nonogi H, Goto Y, Iwai N.	Validation of the association between the gene encoding 5-lipoxygenase-activating protein and myocardial infarction in a Japanese population.	Circulation J	69	1029-1034	2005
Kajimoto K, Shioji K, Tago N, Tomoike H, Nonogi H, Goto Y, Iwai N.	Assessment of MEF2A mutations in myocardial infarction in Japanese patients.	Circulation J	69	1192-1195	2005
Iwanaga Y, Nishi I, Ono K, Takagi S, Tsutsumi Y, Ozaki M, Noguchi T, Takaki H, Iwai N, Nonogi H, Goto Y.	Angiotensin-converting enzyme genotype is not associated with exercise capacity or the training effect of cardiac rehabilitation in patients after acute myocardial infarction.	Circulation J	69	1315-1319	2005

Suzuki S, Takaki H, Yasumura Y, Sakuragi S, Takagi S, Tsutsumi Y, Aihara N, Sakamaki F, Goto Y.	Assessment of quality of life with 5 different scales in patients participating in comprehensive cardiac rehabilitation after acute myocardial infarction.	Circulation J	69	1527-1534	2005
Iwanaga Y, Nishi I, Furuichi S, Noguchi T, Sase K, Kihara Y, Goto Y, Nonogi H.	B-type natriuretic peptide strongly reflects diastolic wall stress in patients with chronic heart failure.	J Am Coll Cardiol	47	742-748	2006
Tanaka M, Goto Y, Suzuki S, Morii I, Otsuka Y, Miyazaki S, Nonogi H.	Postinfarction cardiac rupture despite immediate reperfusion therapy in a patient with severe aortic valve	Heart Vessels	21	59-62	2006
Koji Kimura, Takako Goto, Kentarou Yagi, Hidekazu Furuya, Shio Jujo, Johbu Itoh, Sadaaki Sawamura, Shirosaku Koide, Hidezo Mori, Naoto Fukuyama	Biphasic of inducible nitric oxide synthase in a hind limb ischemia model.	J.Clin.Biochem. Nutr	Vol38:2	1-8	2006

A Novel Micro-Angiography Detecting Angiogenesis, Application for Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells Transplantation in the Patients with Critical Limb Ischemia

Kazuhiro Nishigami, Takeshi Nakatani, Masaaki Chiku, Hidezo Mori

National Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka
565-8565, Japan

Summary. Conventional Anigiographic Findings in Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells Transplantation for Critical Limb Ischemia: Bone marrow mononuclear cells have many of the characteristics of stem cells for mesenchymal tissues, and secrete many angiogenic cytokines. We performed autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells in six patients with critical limb ischemia due to Buerger disease, who were not candidates for catheter or surgical revascularization. Leg pains at rest and skin ulcers improved after bone marrow transplantation in all patients, although significant collateral developments after the therapy by conventional angiography could not be observed. Autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells including stem cells improved critical limb ischemia due to Buerger disease. Neovascularization after therapeutic angiogenesis might be quite small and could not be visualized by conventional angiography.

Novel Micro-angiography: We developed in-hospital micro-angiographic equipment which consisted of a high power X-ray source for computed tomography and an avalanche type detector characterized by a high spatial resolution (20 μ m) and high sensitivity (100 times of CCD camera). We visualized mid-zone collaterals after femoral arterial exfoliation with and without therapeutic angiogenesis in rabbit ischemic limbs and assessed the radio-absorptions in a clinical setting. The micro-angiography clearly demonstrated mid-zone collaterals after the treatment with a diameter of down to 50 μ m, but the conventional angiography did not. The sum of ra-

dio-absorptions for 10 seconds in clinical settings was 300 mSv. The newly developed in-house micro-angiography could illuminate micro-vessels with a diameter of down to 50 μ m in clinical settings safely and could be useful in the evaluation of therapeutic angiogenesis.

Keywords. Micro-angiography, Angiogenesis, Autologous bone marrow mononuclear cells transplantation, Critical limb ischemia, Buerger disease

Introduction

Endothelial progenitor cells (EPCs) possess the ability to mature into cells that line the lumen of blood vessels(Asahara T, et al. 1997). Therapeutic angiogenesis could be induced by the transplantation of bone marrow mononuclear cells including EPCs. Several studies demonstrated that therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow mononuclear cells transplantation (BMT) was effective for ischemic vascular diseases although conventional angiography could not precisely detect developed collaterals after therapeutic angiogenesis(Iba O, et al. 2002, Inaba S, et al. 2002, Shintani S, et al. 2001, Tateishi-Yuyama E, et al. 2002). We developed an in-hospital micro-angiographic equipment which consisted of a high power X-ray source for computed tomography and an avalanche type detector characterized by a high spatial resolution (20 μ m) and high sensitivity (100 times of CCD camera).

The purpose of the present study was to evaluate the clinical effects and conventional angiographic findings on BMT for critical limb ischemia, and to validate the usefulness and safety of the novel micro-angiography technique for the evaluation of therapeutic angiogenesis.

Methods

Patients

Patients qualified for autologous BMT if they had chronic critical limb ischemia including rest pain and/or non-healing ischemic ulcers for a minimum of 4 weeks without evidence of improvement in response to

conventional therapies and were not optimal candidates for surgical or catheter revascularization. Buerger's disease was diagnosed by segmental occlusion of small- and medium-sized arteries, absence of atherosclerosis, and corkscrew collaterals circumventing the occlusion in angiogram and the exclusion of autoimmune diseases such as scleroderma or systemic lupus erythematosus, hypercoagulable states, diabetes, or acute arterial occlusion secondary to embolism. Patients with retinopathy and/or malignancy were excluded. Although 30 patients with atherosclerotic peripheral artery disease were candidates for BMT, they were excluded from the present study due to their systemic atherosclerotic complications. Six patients with Buerger's disease were recruited for the present study. All patients had leg pain at rest and five patients had foot ulcers. Written consent was obtained from all participants of this study. This clinical trial of autologous BMT for the treatment of patients with critical ischemia was approved by the Medical Ethics Committee of the National Cardiovascular Center.

Autologous BMT

Bone marrow fluid (700-800ml) was collected from the iliac bone under general anesthesia. The harvested bone marrow fluid was diluted with RPMI 1640 (Nikken Bio Medical Laboratory, Kyoto, Japan) containing heparin, then stored in a sterile pack from the Bone Marrow Collection Kit (Baxter, IL, USA). The mononuclear cell fraction was prepared with a Fresenius AS104 (AMCO, USA). The injection volume was 0.5ml and injections were spaced 2-3cm apart, using a 1ml syringe and a 27-gauge needle. Leg pains were measured by a visual analog pain scale and foot ulcers were evaluated by area and appearance.

Novel micro-angiography

The in-hospital micro-angiographic equipment consisted of a high power X-ray source for computed tomography and an avalanche type detector characterized by a high spatial resolution (20 μ m) and high sensitivity (100 times of CCD camera) (Fig.1).

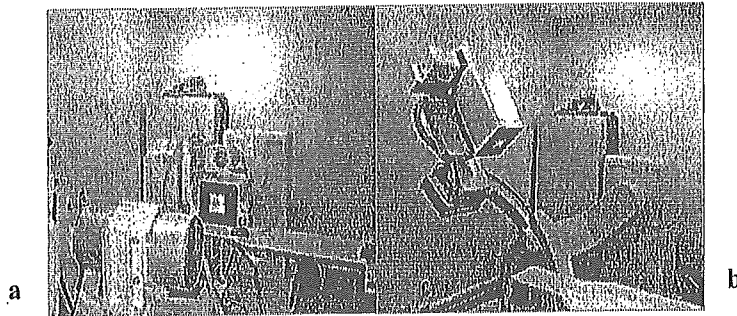


Fig. 1a, b. The micro-angiographic equipment that we developed. High-voltage power X-ray source a and a detecting system with a high spatial resolution (25 μ m) and high sensitivity (100 times of CCD camera) b.

Limb ischemia models in rabbits were made by ligating the femoral artery and treated by fibroblast growth factor 4 (FGF-4) genes incorporated to gelatin hydro gel (GHG). One month after the treatment, we evaluated collateral micro-vessels by using conventional and micro-angiographic systems. The approach was via the left femoral artery so that the catheter was located in the abdominal aorta. A 5ml bolus of Iodine contrast medium (300mg/ml) was injected at 3ml/sec using an auto-injection system. Imaging was recorded using a digital source in 1000 x 1000 pixels. The sum of radio-absorptions for 10 seconds in clinical settings was studied.

Results

Autologous BMT for Critical Limb Ischemia

The number of transplanted bone marrow mononuclear cells were one to five multiplied 10^9 . Rest pains decreased or disappeared in one month after BMT (Fig.2) and Skin ulcers improved in one to three months after BMT in all patients (Fig.3).

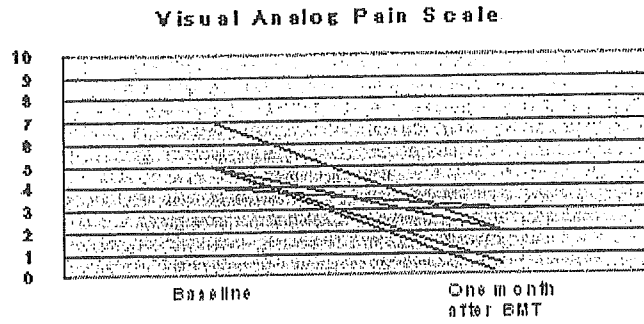


Fig. 2. The Visual analog pain scale in all patients.

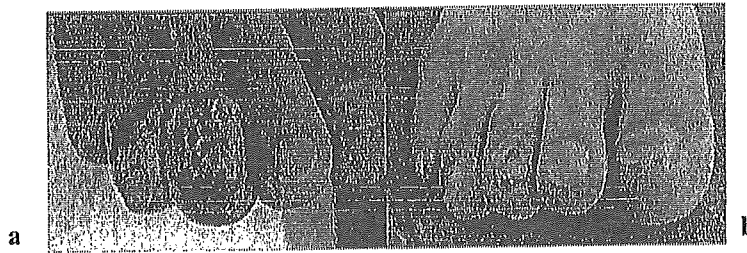


Fig. 3a, b. The skin ulcers in a patient before a and one month after autologous bone marrow transplantation b.

Conventional angiography was performed before and one month after BMT, but there was no significant changes in any of the patients (Fig.4).

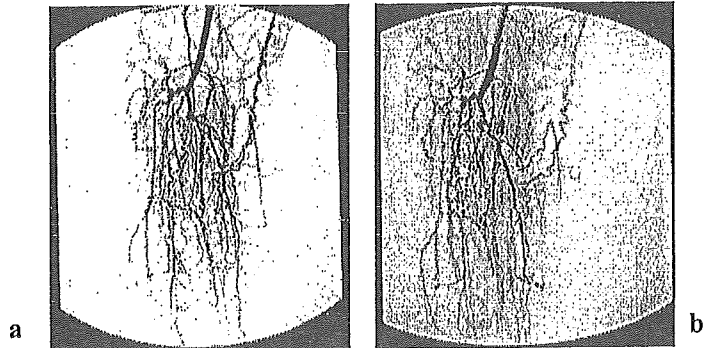


Fig. 4a, b. The conventional angiographic findings in the patient before a and one month after autologous bone marrow transplantation b.

Novel micro-angiography

The novel micro-angiography can detect to within a limit 50 of μm , although a detection limit of a conventional angiography is 250 μm (Fig.5).

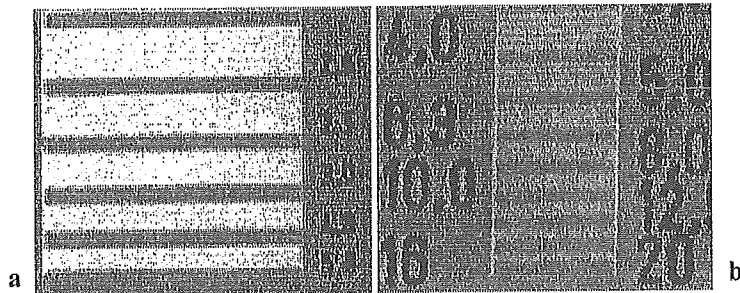


Fig. 5a, b. The detection limits on a conventional angiography a and the novel micro-angiography b using a line chart

Collateral micro-vessels, which were 100-500 μm or less in diameter, were demonstrated more clearly in micro-angiography than conventional angiography (Fig.6).

The sum of radio-absorptions at the point of 1m distance from the X-ray source in clinical settings was 300 mSv. for 10 seconds.

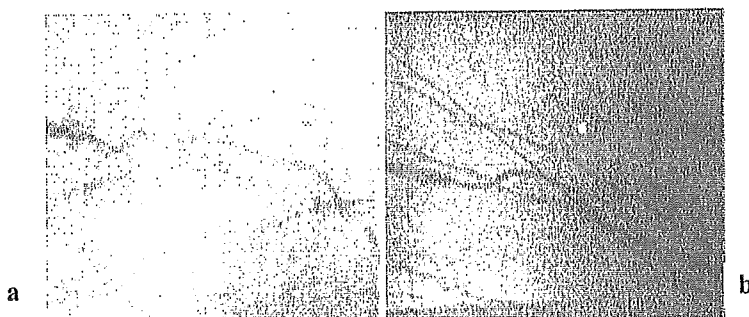


Fig. 6a, b. In 2.5x2.5cm view size, Collateral micro-vessels after therapeutic angiogenesis in the rabbit limb ischemia model. Vessel sizes in the range of 100-500µm or less, were demonstrated in the novel micro-angiography b more clearly than in a conventional angiography a. The diameter of the line in the micro-angiography is 130µm.

Discussion

Autologous BMT improved chronic severe limb ischemia due to Buerger's disease. Conventional angiography could not disclose developed collateral vessels after BMT. A novel micro-angiography technique could illuminate promoted collateral vessels after therapeutic angiogenesis in rabbit models although a conventional angiography did not. The sum of radio-absorptions in the novel angiography could be accepted in clinical settings.

Autologous BMT and Buerger's disease

Bone marrow harvests need an amount of more than 500ml bone marrow fluid and general anesthesia in therapeutic angiogenesis using BMT. Such factors have practical limitations to select candidates with peripheral artery disease complicated with systemic atherosclerosis and aging for BMT. Buerger's disease is a segmental vasculitis that affects the distal arteries of the upper and lower extremities. It typically occurs in young people. The majority of patients with Buerger's disease have pain at rest and digital