

7. 制動X線の疑似単色化とデジタル拡大撮影

ターゲット材の融点等の問題から、セリウムを用いて微小焦点X線管を製作することは難しい。ここでは100 μm タングステン管付きポータブルX線装置から発生する制動X線を疑似単色化し、ヨウ素造影に適したスペクトルにした後、3倍拡大撮影による造影を試みた。撮影には厚さ3.0 mmのアルミニウムフィルターを用い、管電圧と撮影距離(X線源とイメージングプレート間)はそれぞれ60 kVと1.5 mであった。また管電圧と電流がそれぞれ60 kVと0.5 mAのとき、X線強度は線源から1.0 mの位置で26.0 $\mu\text{Gy/s}$ であった。

撮影に使用したCRのサンプリングピッチは87.5 μm であるが、8 LP (62.5 μm)の線が認識できた (Fig. 16)。また犬の心臓の造影でも100 μm 程度の血管が観察でき、線源側に厚さ100 mmの亚克力板を用いた場合でも画像のコントラストはそれほど変化しなかった (Fig. 17)。

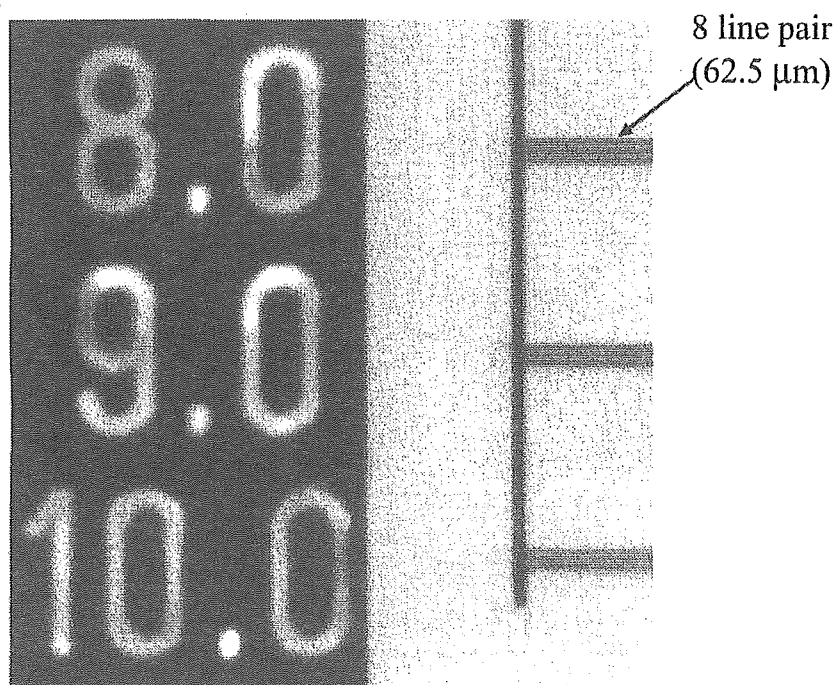


Fig. 16. Magnification radiogram of a test chart.

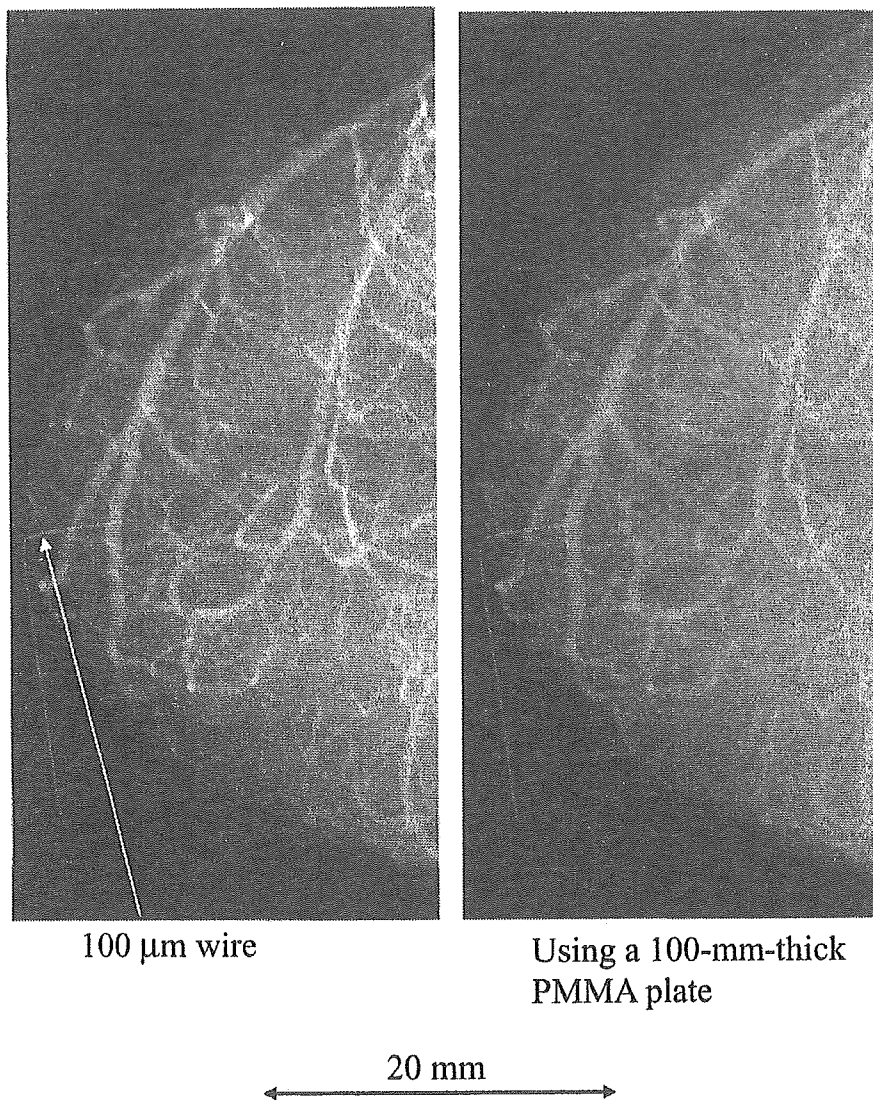


Fig. 17. Magnification angiograms of a dog heart.

7. おわりに

低フォトンエネルギープラズマX線装置では充電電圧の増加により、高調波が観測された。これらの高調波は制動X線のプラズマ内での吸収により発生したと思われる。要するに、K系列特性X線の整数倍のフォトンエネルギーに相当する制動線がプラズマを透過し易いと想像される。次にモリブデン管付き高フォトンエネルギープラズマX線装置ではジルコニウムフィルターによりKB線が吸収され難く、この現象はKB線の線吸収係数が低下したためと思われる。

セリウムX線装置から発生するK系列特性X線はシャープで、前述のように硫酸バリウムのフィル

ターを用いた場合には $K\alpha$ 線を有効に用いることができる。しかし $K\beta$ 線も効率よく吸収されることから、酸化セリウムのフィルターも有用であると思われる。現在、回転陽極管を製作するための基礎実験を行っており、高線量率セリウム管も実現するかもしれない。

血管のコントラストは若干劣るが、アルミニウムフィルター等を使って発生する疑似単色制動X線も有効であった。さらに被曝線量を考慮する必要はあるが、拡大撮影による空間分解能の向上、散乱線の低減、そして位相コントラスト効果の付加は、これからのデジタル撮影には必須であると思われる。100 W級の10 μm フォーカス回転陽極管が実用化され、加えてkW級の100 μm フォーカス管は製作可能であることから、特に高精細撮影を行う場合には小焦点管をお勧めする。

謝辞

本研究は文部科学省、厚生労働省、私学振興財団、JST、NEDO、そして岩手県からの研究助成金により遂行されている。

文献

1. J.J. Rocca, V. Shlyaptsev, F.G. Tomasel, O.D. Cortazar, D. Hartshorn and J.L.A. Chilla, "Demonstration of a discharge pumped table-top soft x-ray laser," *Phys. Rev. Lett.*, **73**, 2192-2195, 1994.
2. K. Yoshiaki, A. Nagashima, K. Nagashima, M. Kado, T. Kawachi, N. Hasegawa, M. Tanaka, A. Sasaki and K. Moribayashi, "X-ray lasers driven by optical lasers," *AIP Conference Proc.*, **506**, 613-620, 1999.
3. J.J.G. Rocca, J.L.A. Chilla, S. Sakadzic, A. Rahman, J. Filevich, E. Jankowska, E.C. Hammarsten, B.M. Luther, H.C. Kapteyn, M. Murnane and V.N. Shlyapsev, "Advances in capillary discharge soft x-ray laser research," *SPIE*, **4505**, 1-6, 2001.
4. S. Le Pape, Ph. Zeitoun, J.J.G. Rocca, A. Carillon, P. Dhez, M. Francois, S. Hubert, M. Idir and D. Ros, "Characterisation of an x-ray laser beam," *SPIE*, **4505**, 23-34, 2001.
5. C. Gerth, "Free-electron laser at the TESLA test facility at DESY: toward a tunable short-pulsed soft x-ray source," *SPIE*, **4505**, 131-145, 2001.
6. A. C. Thompson, H. D. Zeman, G. S. Brown, J. Morrison, P. Reiser, V. Padmanabahn, L. Ong, S. Green, J. Giacomini, H. Gordon and E. Rubenstein, "First operation of the medical research facility at the NSLS for coronary angiography," *Rev. Sci. Instrum.*, **63**, 625-628, 1992.
7. H. Mori, K. Hyodo, E. Tanaka, M. U. Mohammed, A. Yamakawa, Y. Shinozaki, H. Nakazawa, Y. Tanaka, T. Sekka, Y. Iwata, S. Honda, K. Umetani, H. Ueki, T. Yokoyama, K. Tanioka, M. Kubota, H. Hosaka, N. Ishizawa and M. Ando, "Small-vessel radiography in situ with monochromatic synchrotron radiation," *Radiology*, **201**, 173-177, 1996.
8. K. Hyodo, M. Ando, Y. Oku, S. Yamamoto, T. Takeda, Y. Itai, S. Ohtsuka, Y. Sugishita and J. Tada, "Development of a two-dimensional imaging system for clinical applications of intravenous coronary angiography using intense synchrotron radiation produced by a multipole wiggler," *J. Synchrotron Radiat.*, **5**, 1123-1126, 1998.
9. T. J. Davis, D. Gao, T. E. Gureyev, A. W. Stevenson and S. W. Wilkins, "Phase-contrast imaging of weakly absorbing materials using hard x-rays," *Nature*, **373**, 595-597, 1995.
10. A. Momose, T. Takeda, Y. Itai and K. Hirano, "Phase-contrast x-ray computed tomography for observing

biological soft tissues," *Nature Medicine*, **2**, 473-475, 1996.

11. M. Ando, A. Maksimenko, H. Sugiyama, W. Pattanasiriwisawa, K. Hyodo and C. Uyama, "A simple x-ray dark- and bright- field imaging using achromatic Laue optics," *Jpn. J. Appl. Phys.*, **41**, L1016-L1018, 2002.
12. S. W. Wilkins, T. E. Gureyev, D. Gao, A. Pogany and A. W. Stevenson, "Phase-contrast imaging using polychromatic hard x-rays," *Nature*, **384**, 335-338, 1996.
13. A. Ishisaka, H. Ohara and C. Honda, "A new method of analyzing edge effect in phase contrast imaging with incoherent x-rays," *Opt. Rev.*, **7**, 566-572, 2000.
14. H. Ohara, C. Honda, A. Ishisaka and F. Shimoda, "Image quality in digital phase contrast imaging using a tungsten anode x-ray tube with a small focal spot size," *SPIE*, **4682**, 1-11, 2002.
15. E. Sato, K. Sato, T. Usuki and Y. Tamakawa, "Film-less computed radiography system for high-speed imaging," *Ann. Rep. Iwate Med. Univ. Sch. Lib. Arts and Sci.*, **35**, 13-23, 2000.
16. E. Sato, Y. Hayasi, R. Germer, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, H. Obara, T. Ichimaru, K. Takayama and H. Ido, "Intense characteristic x-ray irradiation from weakly ionized linear plasma and applications," *Jpn. J. Med. Imag. Inform. Sci.*, **20**, 148-155, 2003.
17. E. Sato, Y. Hayasi, R. Germer, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, H. Obara, T. Ichimaru, K. Takayama and H. Ido, "Irradiation of intense characteristic x-rays from weakly ionized linear molybdenum plasma," *Jpn. J. Med. Phys.*, **23**, 123-131, 2003.
18. E. Sato, Y. Hayasi, R. Germer, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, K. Takayama and H. Ido, "Quasi-monochromatic flash x-ray generator utilizing weakly ionized linear copper plasma," *Rev. Sci. Instrum.*, **74**, 5236-5240, 2003.
19. E. Sato, Y. Hayasi, R. Germer, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, S. Sato, K. Takayama and H. Ido, "Sharp characteristic x-ray irradiation from weakly ionized linear plasma," *J. Electron Spectrosc. Related Phenom.*, **137-140**, 713-720, 2004.
20. E. Sato, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, S. Sato and K. Takayama, "Clean monochromatic x-ray irradiation from weakly ionized linear copper plasma," *Opt. Eng.*, **44**, 049002-1-6, 2005.
21. E. Sato, M. Sagae, E. Tanaka, Y. Hayasi, R. Germer, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, S. Sato, K. Takayama and H. Ido, "Quasi-monochromatic flash x-ray generator utilizing a disk-cathode molybdenum tube," *Jpn. J. Appl. Phys.*, **43**, 7324-7328, 2004.
22. E. Sato, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, S. Sato, K. Takayama and H. Ido, "Compact monochromatic flash x-ray generator utilizing a disk-cathode molybdenum tube," *Med. Phys.*, **32**, 49-54, 2005.
23. E. Sato, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Inoue, A. Ogawa, S. Sato, K. Takayama and H. Ido, "High-speed K-edge angiography achieved with tantalum K-series characteristic x rays," *SPIE*, **5745**, 810-817, 2005.
24. E. Sato, Y. Hayasi, R. Germer, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, S. Sato, K. Takayama and H. Ido, "Portable x-ray generator utilizing a cerium-target radiation tube for angiography," *J. Electron Spectrosc. Related Phenom.*, **137-140**, 699-704, 2004.
25. E. Sato, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, S. Sato, K. Takayama and H. Ido, "Demonstration of enhanced K-edge angiography using a cerium target x-ray generator," *Med. Phys.*, **31**, 3017-3021, 2004.

心血管疾患における細胞-遺伝子ハイブリッド治療

国立循環器病センター研究所心臓生理部 宮原 義典, 盛 英三
国立循環器病センター研究所再生医療部 永 谷 憲 歳

はじめに

1980年代より遺伝性疾患を皮切りに、悪性腫瘍、自己免疫疾患などに対して遺伝子治療の臨床応用が開始され、現在では欠損遺伝子や変異遺伝子を補充する治療法から、生体の治癒力を補う目的の治療にも拡大施行されている。循環器疾患における遺伝子治療は、1994年に米国のタフツ大学で VEGF（血管内皮細胞増殖因子）遺伝子の虚血肢への血管内投与という形で行われ、血管再生効果が確認された。以後、循環障害に対する遺伝子治療の臨床応用が多くの施設で行われている。

また、日本では1997年に臓器移植法が施行され、心臓、肺などの脳死臓器移植が可能となったが、ドナー不足のためにこれまで二十数例が施行されるにとどまっている。末期の臓器不全に対して何らかの代替治療が必要とされている中で、体性幹細胞移植や tissue-engineering などの再生医療が注目を集めている。当施設では、2004年より既存の治療に抵抗性の重症拡張型心筋症および虚血性心筋症の患者に対して、間葉系幹細胞移植の臨床研究を開始している。

われわれはこの遺伝子治療と細胞移植治療をハイブリッドし、基地 (base) となる機能細胞に補完的機能をもつ遺伝子を導入するという遺伝子-細胞ハイブリッド治療を考案した。遺伝子を格子

構造を有する生分解性ゼラチンに取り込ませ、このゼラチン-遺伝子複合体を貪食能を有する細胞に導入させる方法である。われわれは正常な血管床の再生という点に主眼を置き、細胞-遺伝子ハイブリッド治療を原発性肺高血圧症に応用した。

本稿では、ゼラチンを用いた遺伝子導入法、ゼラチン-遺伝子複合体、肺高血圧症に対する細胞-遺伝子ハイブリッド治療の研究成果について概説する。

ゼラチンを用いた遺伝子導入法

従来用いられてきた代表的な遺伝子導入法として、プラスミド DNA そのものを組織に投与する方法、アデノウイルスやレトロウイルスなどのウイルスベクターを用いる方法などがあげられる。しかし、プラスミド DNA の直接投与では組織内で拡散・希釈され、細胞核内に到達する前に核酸分解酵素により分解されてしまうため、有効な治療効果を得るには大量の遺伝子を準備する必要がある。また、ウイルスベクター法は導入効率が良いものの、ウイルス蛋白の抗原性、ウイルスの突然変異の懸念など、安全性に重大な問題がある。われわれが考案した細胞-遺伝子ハイブリッド化は、*ex vivo* でウイルスベクターを用いることなく細胞への遺伝子導入が高効率に行える次世代の

[Key words] 細胞-遺伝子ハイブリッド治療, 血管新生, 肺高血圧症

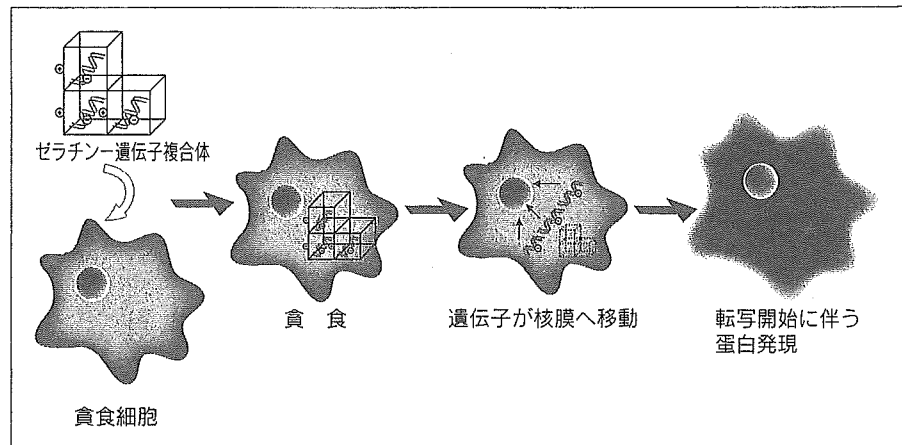


図1 ゼラチンを用いた遺伝子導入の概念図

貪食細胞がゼラチン-遺伝子複合体を取り込んだ後、ゼラチンは細胞内で分解され、封入されていた遺伝子が核膜へ向かい、蛋白発現に向けたプロセスが開始される。

遺伝子導入法である(図1)。このハイブリッド化を実現する鍵となる物質が生分解性ゼラチンである。

ブタの皮膚から抽出したゼラチンをグルタルアルデヒドの架橋反応により格子構造とし、エチレンジアミンを加えると正帯電ゼラチンが完成する²⁾。この正帯電ゼラチンの特徴として、

- ① 陽性に帯電しているので、陰性に帯電しているDNAや蛋白質と数時間接触することにより容易にイオン結合し、電気的複合体を形成する。
 - ② 構造が3次元格子状なので、結合物質をゲル内部に保護することにより、分解酵素の影響を受けにくくする。
 - ③ 生体内で徐々に分解を受けて、この分解に伴い結合物質を徐々に放出する。
 - ④ その分解速度はゼラチンの架橋度を変えることにより自由に調節できる。
 - ⑤ ゼラチン-遺伝子複合体は貪食細胞(単球、マクロファージなど)に容易に貪食される。
 - ⑥ 貪食細胞内で高率に遺伝子を発現する。
- などがあげられる。

われわれはゼラチンを、その構造や表面電荷を自由に変えることが容易である性質から遺伝子の

担体として利用することを着想した。遺伝子をあらかじめゼラチンの格子構造内へ封入してゼラチン-遺伝子複合体を形成し、生体内へ投与することで核酸分解酵素による遺伝子の分解・代謝が緩徐となり、結果として安全かつ高効率に遺伝子を導入することができると考えられる。実際に遺伝子をゼラチンと結合させて投与したところ、生体内における遺伝子の残存期間を延長させることに成功し、遺伝子の発現率も従来の遺伝子単独投与と比較して約10倍の増加が認められた³⁾。

ゼラチン-アドレノメデュリン遺伝子複合体による血管新生療法

血管内皮細胞から産生されるアドレノメデュリンは、生体内で最も強い血管拡張作用を示すペプチドであり⁴⁾、血管新生促進や抗アポトーシス作用などの多様な生理活性を併せもつ。われわれは家兎下肢虚血モデルを用いてゼラチン-アドレノメデュリン遺伝子複合体の治療効果を検討した⁵⁾。大腿動脈摘除後10日目に大腿筋肉内にアドレノメデュリン遺伝子そのもの、およびゼラチン-アドレノメデュリン遺伝子複合体を投与した群を作製し、4週間後に下腿血圧、組織血流量および組

織内の毛細血管密度を調べた。いずれの治療もコントロール群と比較して著明な血管新生および血流改善効果を認めたが、ゼラチン-アドレノメデュリン遺伝子複合体投与群が有意に勝っており(図 2a, b, c), 血管造影でもより多くの再生血管が描出された(図 2d)。また、筋肉組織中のアドレノメデュリン濃度は投与後 2 週間にわたって遺伝子単独投与群よりも高値を示した(図 2e)。この事実により、アドレノメデュリン遺伝子をゼラチン内に封入して投与することで、遺伝子が虚血組織内で長期にわたり高濃度に維持され、徐放されながら遺伝子導入を果たし、より効果的な血管新生の発現が得られたと考えられる。

ゼラチンを介した細胞-遺伝子ハイブリッド治療

遺伝子または調節因子の投与のみでは代謝による影響があり、必要とされる場所への有効量の到達の面で限界がある。この問題を解決するために 1991年に細胞を遺伝子発現の基地として用いる cell-based の遺伝子治療が Plautz らによって始められた⁶⁾。これをさらに発展させた細胞-遺伝子ハイブリッド治療は、貪食能をもつ機能細胞にゼラチン-遺伝子複合体を取り込ませて遺伝子導入を行う。つまり、細胞が遺伝子発現の基地としてだけでなく、治療要素としての働きをもつことになる。細胞移植の観点から言い換えれば、移植細胞の機能強化のために遺伝子治療を併用した治療法といえる。細胞-遺伝子ハイブリッド治療は、ベクターにウイルスを使用せず、ゼラチンを用いることで安全性と効率の高い遺伝子導入を実現する。また、移植したマクロファージや単球などの貪食細胞が自身の走化性によって障害部位に特異的に集まるため、標的組織へ凝集したこれらの細胞が導入された遺伝子をもとにタンパク質を合成し、より高い治療効果を上げると考えられる。

血管内皮前駆細胞を用いた原発性肺高血圧に対する細胞-遺伝子ハイブリッド治療

1997年 Asahara らは、血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cells: EPCs) が生体内で虚血や血管内皮障害が起こったときに骨髄から末梢血中に動員され、障害部位に遊走・付着し、血管内皮細胞に分化して血管を形成することを明らかにした^{7,8)}。また、われわれは EPCs がマクロファージのような貪食能を有し、ゼラチン-遺伝子複合体を貪食することを発見した⁹⁾。EPCs の移植は虚血性心疾患、閉塞性動脈硬化症の治療に有効であることが報告されており^{10,11)}、この効果は、① EPCs 自身が血管形成に加わることで、② EPCs が VEGF などの血管新生因子を放出して局所の血管新生を促すためと考えられる。

原発性肺高血圧症の病態は、血管内皮細胞の機能障害およびそれに基づく血管作動物質の不均衡であると考えられている(図 3)。われわれは、肺血管床で強力な拡張因子として働くアドレノメデュリンを血管内投与することで、平均肺動脈圧を低下させることができることを示してきた¹²⁾。アドレノメデュリンの特異的受容体は、体血管よりもむしろ肺血管に多数存在し¹³⁾、血管平滑筋の受容体に直接作用して cAMP を増加させたり、血管内皮細胞に働き一酸化窒素を介して血管拡張を引き起こす¹⁴⁾。故に、原発性肺高血圧症は細胞-遺伝子ハイブリッド治療が適している疾患と考えられた。

まず、アドレノメデュリン遺伝子をゼラチンに封入して *ex vivo* にて EPCs に取り込ませた(図 4a, b, c)。この EPCs の貪食による遺伝子導入は、ウイルスベクターを用いずに EPCs 自身への 50~70% という高効率の遺伝子導入を可能にした。近年アドレノメデュリンは PI3K-Akt 経路を活性化することで血管内皮細胞の生存、遊走、増殖に関与することがわかり、アドレノメデュリン遺伝子を導入することで EPCs 自身のアポトーシス抑制、増殖促進の効果も得られることが明らか

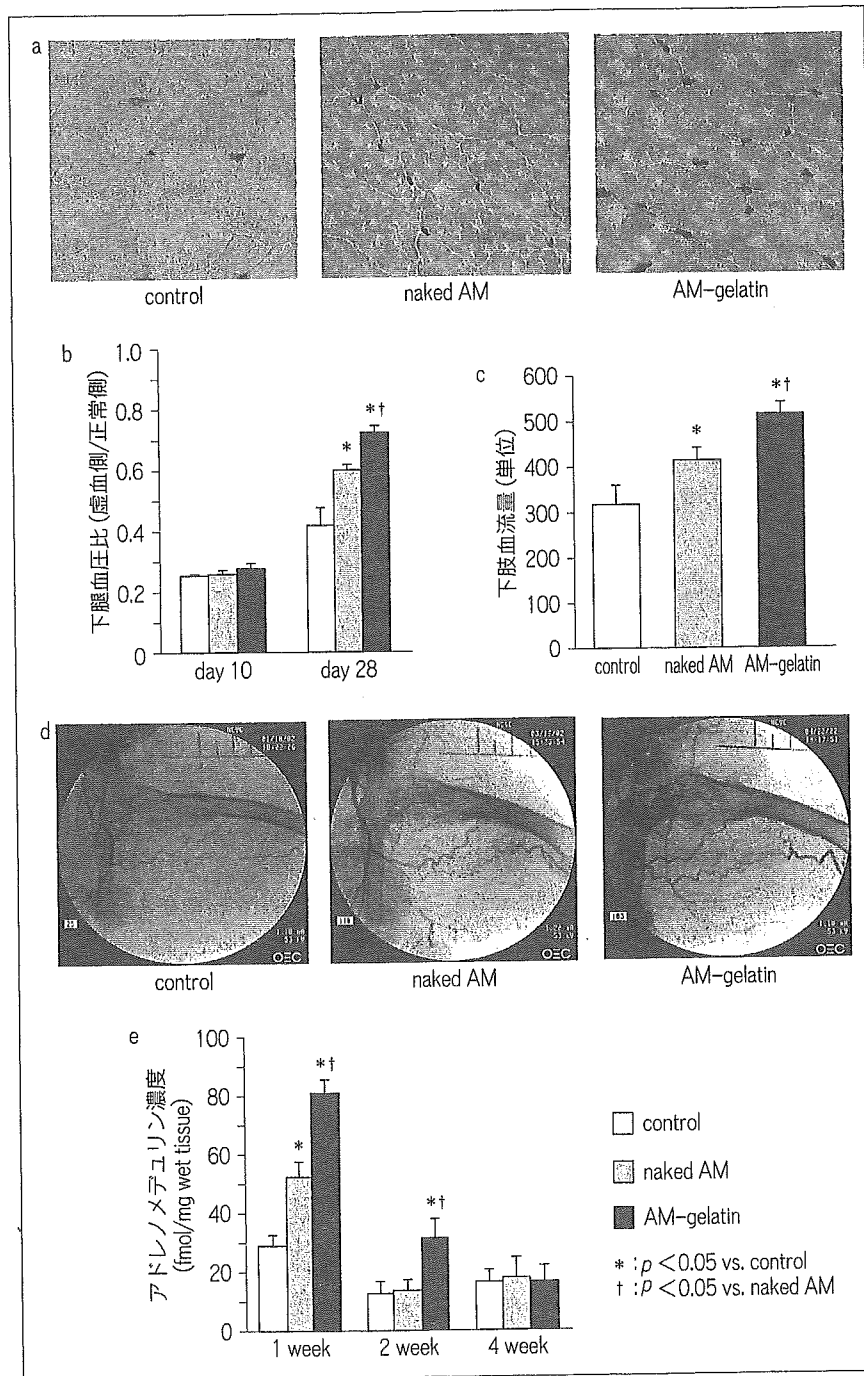


図2 ゼラチン-アドレノメデュリン遺伝子複合体の血管新生効果

naked AM : アドレノメデュリン遺伝子単独投与群, AM-gelatin : ゼラチン-アドレノメデュリン遺伝子複合体投与群

a : 虚血側大腿筋のアルカリホスファターゼ染色による毛細血管密度の比較 (×200).

b, c : 下腿血圧および下腿血流量は複合体投与群が有意に勝っていた。

d : 血管造影検査による再生血管の描出。

e : 治療後の筋肉組織内アドレノメデュリン濃度の経時的推移。

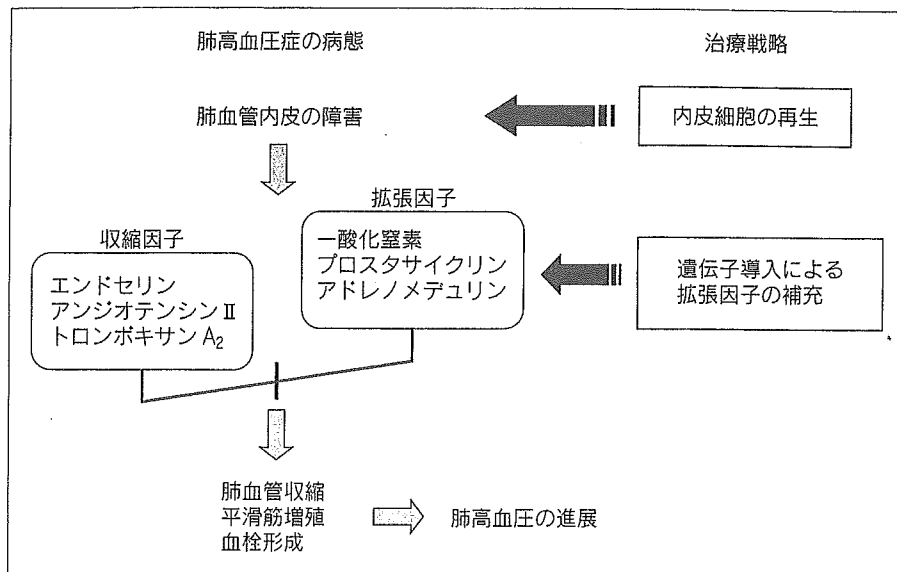


図3 肺高血圧症の病態に基づいた細胞-遺伝子ハイブリッド治療の戦略

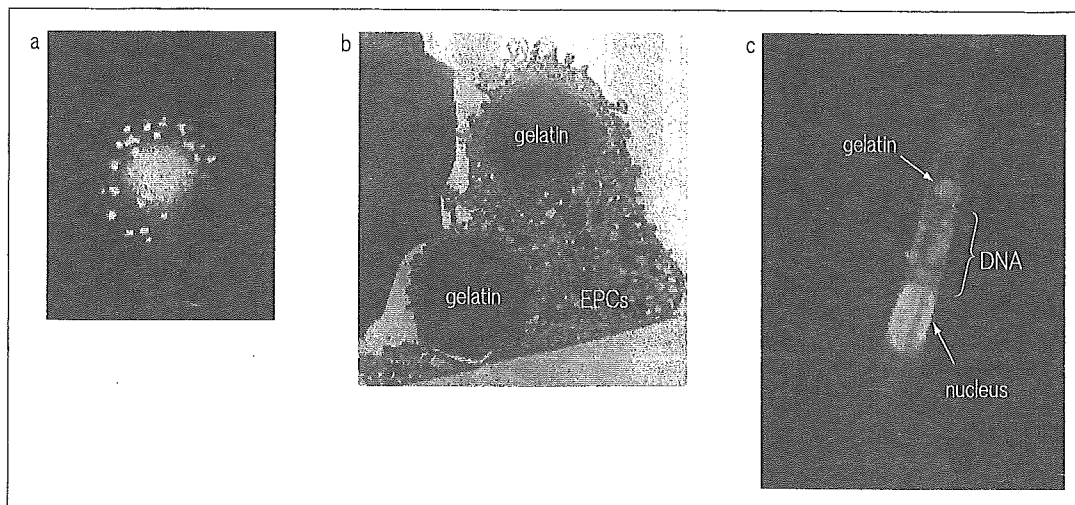


図4 ゼラチンを用いたEPCsへの遺伝子導入

- a: ゼラチンに封入されたアドレノメデュリン遺伝 (RITC-labeled)
 b: ゼラチンを貪食した血管内皮前駆細胞
 c: ゼラチンから細胞核に向かってDNAが放出される様子。

かになった。

モノクローリン投与にて作製したラット肺高血圧モデルにアドレノメデュリン遺伝子を導入したEPCsを経静脈的に投与し、3週間後に肺高血圧

の軽減効果を検討した⁹⁾。EPCsは肺細動脈と問質に付着し、成熟した血管内皮細胞として血管を形成したが(図5a, b), EPCs単独投与では肺動脈の有意な低下には至らず、肺血管抵抗のわずか

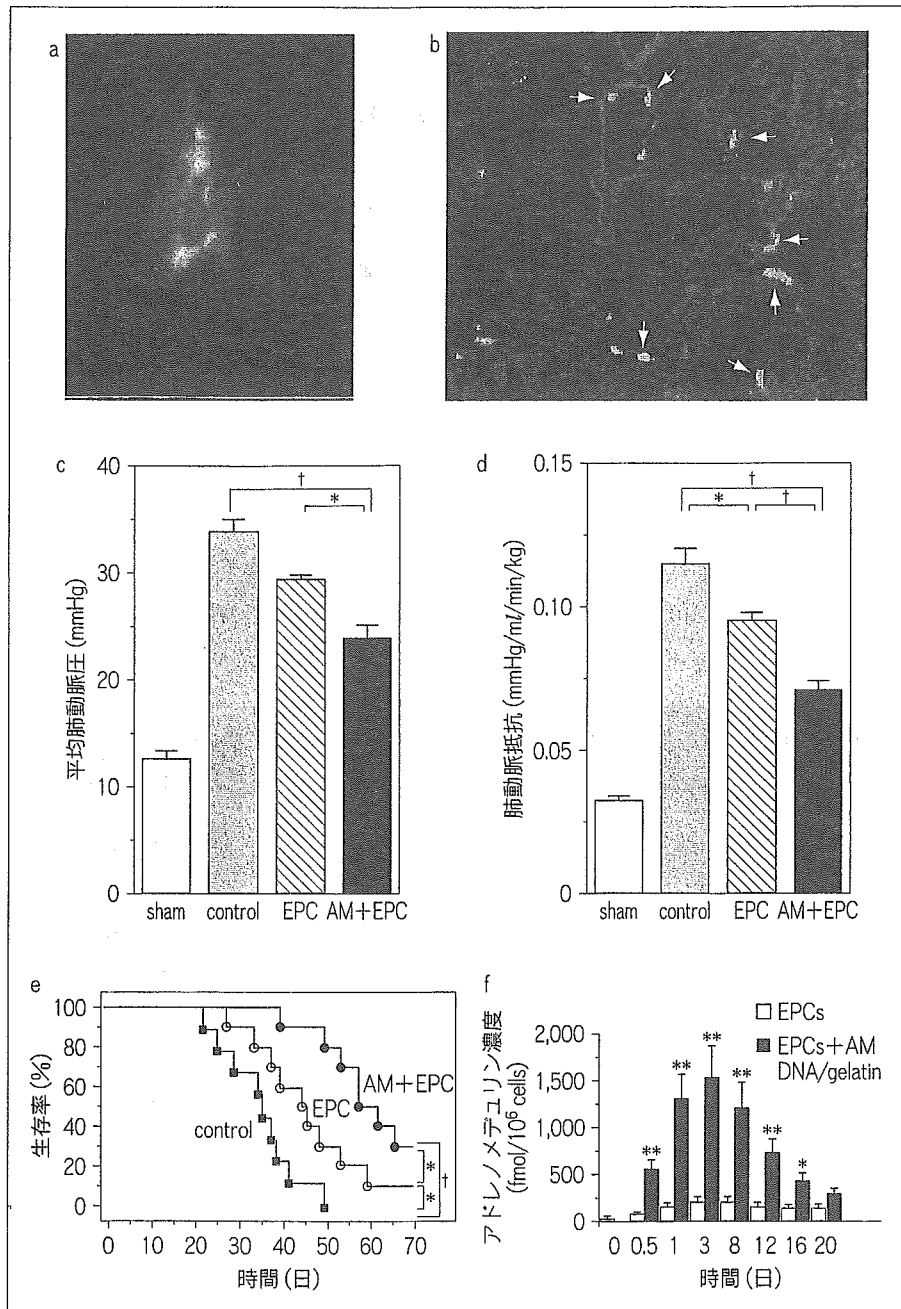


図5 肺高血圧ラットに対する血管内皮前駆細胞とアドレノメデュリン遺伝子のハイブリッド治療の効果

a: GFP 遺伝子導入 EPCs.

b: GFP 発現 EPCs は、肺細動脈の内面や肺組織の間質に付着し、血管を形成した。

c, d, e: アドレノメデュリン遺伝子導入 EPCs の移植により、平均肺動脈圧、肺血管抵抗、および予後が有意に改善した。*: $p < 0.05$, †: $p < 0.01$

f: 培養液中のアドレノメデュリン濃度。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs EPCs

な改善のみにとどまった。一方アドレノメデュリン遺伝子導入 EPCs は平均肺動脈圧および平均肺動脈抵抗を有意に低下させ、生存率を有意に改善させた (図 5c, d, e)。また、アドレノメデュリン遺伝子導入 EPCs は EPCs 単独の約 10 倍のアドレノメデュリンを分泌し、約 3 週間にわたって発現が持続した (図 5f)。原発性肺高血圧症に対する治療としてプロスタサイクリン療法やエンドセリン受容体拮抗薬が開発され、その有効性が報告されているが、これらの治療にも抵抗性の症例が存在し、肺移植の適応とされながらもドナー不足により十分な治療が受けられないのが現状である。この細胞-遺伝子ハイブリッド治療が重症肺高血圧症に対する新たな治療法となる可能性がある。

おわりに

われわれが開発した生分解性ゼラチンを用いた遺伝子導入法は安全性、遺伝子の徐放化による持続発現の点で、従来のウイルスベクターを用いた方法よりも優れている可能性がある。本法は貪食能をもつ細胞であれば利用可能であると考えられ、肺高血圧症や虚血性心疾患などの難治性循環器疾患に対する新たな再生治療として期待されている。

文 献

- 1) Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R et al: Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischemic limb. *Lancet* 1996; **348**: 370-374
- 2) Tabata Y, Nagano A, Ikada Y et al: Biodegradation of hydrogel carrier incorporating fibroblast growth factor. *Tissue Eng* 1999; **5**: 127-138
- 3) Kasahara H, Tanaka E, Fukuyama N et al: Biodegradable gelatin hydrogel potentiates the angiogenic effect of fibroblast growth factor 4 plasmid in rabbit hindlimb ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2003; **41**: 1056-1062
- 4) Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M et al: Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **192**: 553-560
- 5) Tokunaga N, Nagaya N, Shirai N et al: Adrenomedullin gene transfer induces therapeutic angiogenesis in a rabbit model of chronic hind limb ischemia: benefits of a novel nonviral vector, gelatin. *Circulation* 2004; **109**: 526-531
- 6) Plautz G, Nabel EG, Nabel GJ et al: Introduction of vascular smooth muscle cells expressing recombinant genes *in vivo*. *Circulation* 1991; **83**: 578-583
- 7) Asahara T, Murohara T, Isner JM et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; **275**: 964-967
- 8) Asahara T, Kawamoto A: Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; **287**: C572-C579
- 9) Nagaya N, Kangawa K, Mori H et al: Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. *Circulation* 2003; **108**: 889-895
- 10) Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H et al: Therapeutic potential of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001; **103**: 634-637
- 11) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T et al: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; **360**: 427-435
- 12) Nagaya N, Kyotani S, Uematsu M et al: Effects of adrenomedullin inhalation on hemodynamics and exercise capacity in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2004; **109**: 351-356
- 13) Owji AA, Smith DM, Coppock HA: An abundant and specific binding site for the novel vasodilator adrenomedullin in the rat. *Endocrinology* 1995; **136**: 2127-2134
- 14) Nakamura M, Yoshida H, Makita S et al: Potent and long-lasting vasodilatory effects of adrenomedullin in humans. Comparisons between normal subjects and patients with chronic heart failure. *Circulation* 1997; **95**: 1214-1221

Irradiation of orderly multi-line spectra from linear plasma formed by vacuum discharge capillary

Eiichi Sato*^a, Yasuomi Hayasi^a, Rudolf Germer^b, Hidenori Ojima^c,
Kazuyoshi Takayama^c and Hideaki Ido^d

^aDepartment of Physics, Iwate Medical University, 3-16-1 Honchodori, Morioka 020-0015, Japan

^bITP, FHTW FB1 and TU-Berlin, Blankenhainer Str. 9, D 12249 Berlin, Germany

^cShock Wave Research Center, Institute of Fluid Science, Tohoku University, 2-1-1 Katahira, Sendai 980-8577, Japan

^dDepartment of Applied Physics and Informatics, Faculty of Engineering, Tohoku Gakuin University, 1-13-1 Chuo, Tagajo 985-8537, Japan

ABSTRACT

The fundamental experiments for measuring soft x-ray characteristics from the vacuum capillary are described. These experiments are primarily performed in order to generate intense soft x rays. The generator consists of a high-voltage power supply, a polarity-inversion ignitron pulse generator, a turbomolecular pump, and a radiation tube with a capillary. A high-voltage condenser of 200 nF in the pulse generator is charged up to 20 kV by the power supply, and the electric charges in the condenser are discharged to the capillary in the tube after closing the ignitron. During the discharge, weakly ionized plasma forms on the inner and outer sides of a capillary. In the present work, the pump evacuates air from the tube with a pressure of about 1 mPa, and a demountable capillary was developed in order to measure x-ray spectra according to changes in the capillary length. In this capillary, the anode (target) and cathode elements can be changed corresponding to the objectives. The capillary diameter is 2.0 mm, and the length is adjusted from 1 to 50 mm. When a capillary with aluminum anode and cathode electrodes was employed, both the cathode voltage and the discharge current almost displayed damped oscillations. The peak values of the voltage and current increased when the charging voltage was increased, and their maximum values were -11.5 kV and 4.7 kA, respectively. The x-ray durations observed by a 1.6 μm aluminum filter were less than 30 μs . In the spectrum measurement, we observed orderly multi-line spectra. The line photon energies seldom varied according to changes in the condenser charging voltage and to changes in the electrode element. The line number decreased with corresponding decreases in the capillary length.

Keywords: flash x-ray, capillary discharge, vacuum discharge, orderly multi-line spectra, x-ray resonation

1. INTRODUCTION

A number of flash x-ray generators have been developed in order to perform high-speed radiography,¹ and the generators with maximum photon energies of less than 150 keV can be employed to perform soft radiography including biomedical applications.²⁻⁷ Without considering the coherence, we performed preliminary experiments for generating high-intensity K-series characteristic x rays from weakly ionized linear metal plasma.⁸⁻¹¹ In these experiments, we confirmed the irradiation of intense characteristic x rays from the plasma axial direction, because the bremsstrahlung x rays with energies of higher than the K-absorption edge are absorbed effectively and are converted into fluorescen x rays.

In recent years, many valuable discoveries have been made in laser technology, and high brightness x-ray lasers have been generated by optical lasers.¹² Subsequently, the lasers have been produced using a gas-discharge capillary.^{13,14} In these experiments, the laser energy increased with increases in the capillary length, and these kinds of first discharges can generate hot and dense plasma columns with aspect ratios of 1000:1. However, using x-ray amplification by stimulated emission, it is very difficult to increase the x-ray photon energy and the duration.

We performed some experiments for generating K-series characteristic x rays using a vacuum discharge capillary by forming weakly ionized linear plasma. When a capillary with aluminum anode and cathode electrodes was employed, we observed multi-line spectra. These rays could penetrate a 2.4 μm aluminum filter easily, and we found an ordinality in the wave length.

In this paper, we present the experimental results for the low-photon-energy flash x-ray generator with an x-ray tube

utilizing a vacuum-discharge ferrite capillary, and derive a hypothesis concerning soft x-ray resonance without using a resonator.

2. GENERATOR

2.1 High-voltage transmission line

The block diagram including the high-voltage transmission line of a low-photon-energy flash x-ray generator is illustrated in Fig. 1. This generator consists of the following essential components: a high-voltage power supply, a polarity-inversion ignitron-driven pulse generator, a turbomolecular pump, and a radiation tube with a new capillary. A high-voltage condenser of 200 nF in the high-voltage pulse generator is charged up to 20 kV by the power supply, and the electric charges in the condenser are discharged to the capillary in the tube through a 2.0 m coaxial cable after closing the ignitron. The plasma flash x-ray source formed on the inner and outer sides of a capillary, and soft x rays are then produced.

2.2 Low-photon-energy flash x-ray tube

Figure 2 shows schematic drawing of the low-photon-energy flash x-ray tube. This tube is composed of the following major parts: a ferrite capillary (Fig. 3), insulators, and a polymethyl methacrylate chamber. In the present work, the pump evacuates air from the tube with a pressure of about 1 mPa, and a demountable capillary was developed in order to measure x-ray spectra according to changes of the capillary length. In this capillary, the anode (target) and cathode elements can be changed corresponding to the objectives. The capillary diameter is 2.0 mm, and the length is adjusted from 1 to 50 mm.

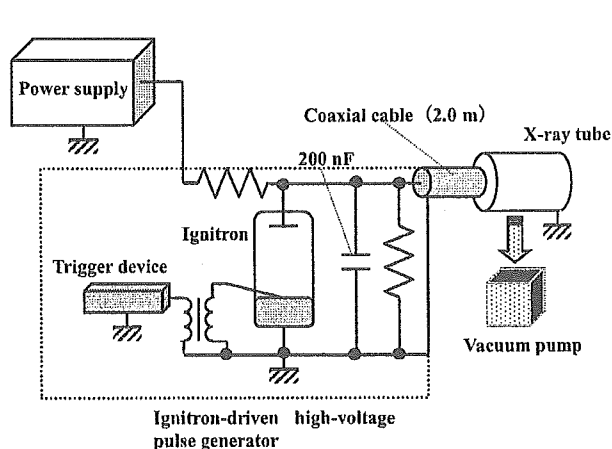


Figure 1: Block diagram including main transmission line of low photon energy flash x-ray generator.

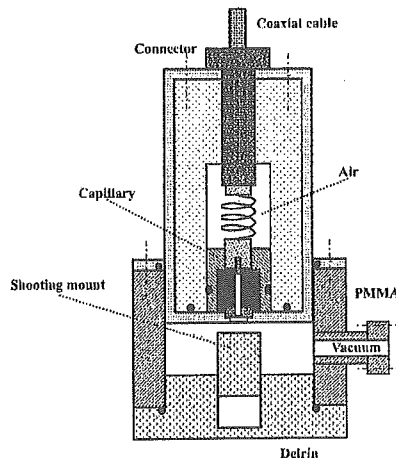


Figure 2: Low-photon-energy flash x-ray tube.

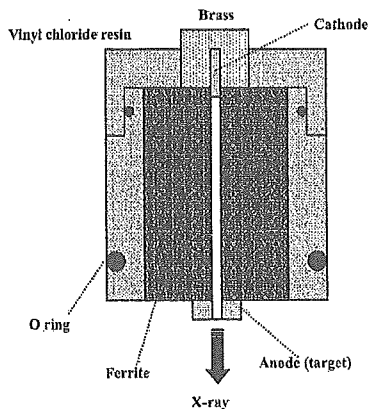


Figure 3: Ferrite capillary.

3. RADIOGRAPHIC CHARACTERISTICS

The cathode voltage, the discharge current, and the x-ray output were measured with a capillary length of 25 mm and a time scale of 5 μ s/div.

3.1 Cathode voltage

The cathode voltages (-1 times the tube voltage) measured by a divider are shown in Fig. 4. The voltages almost displayed damped oscillations, and the peak cathode voltage roughly increased in proportion to the charging voltage. The maximum voltage had a value of -11.5 kV with a charging voltage of 20 kV. In the present work, since the surface-discharge capillary was employed, the electron accelerating voltage was much lower than the tube voltage.

3.2 Discharge current

In order to measure the discharge current, we employed a current transformer (Fig. 5). The discharge currents also displayed damped oscillations. When the charging voltage was increased, both the peak current and the current duration increased. The maximum tube current had a value of 4.7 kA, and the current duration was less than 30 μ s.

3.3 X-ray output

In order to measure soft x rays, a plastic scintillator was employed to decrease electromagnetic noises caused by the vacuum discharge. The fluorescent outputs from the scintillator were lead to a photomultiplier through a plastic fiber, and the output voltages from the photomultiplier were measured by a digital storage scope.

Figures 6 and 7 show the soft x-ray outputs from the capillary according to changes in the charging voltage. Although this flash x-ray generator is primarily designed to produce characteristic x rays of aluminum $K\alpha$, the generator also produces ultraviolet rays and visible lights. When we employed an aluminum filter of 1.6 μ m, extremely soft x rays were detected. Both the pulse height and duration substantially increased with corresponding increases in the charging voltage (Fig. 6). The soft x-ray outputs obtained using an aluminum filter of 6.8 μ m are shown in Fig. 7. When this filter is employed, we can detect K-series characteristic x rays effectively, and the x-ray intensity increased substantially with corresponding increases in the charging voltage.

3.4 Spectra

The x-ray spectra were measured using a holographic plate grating of 1,200 lines per 1 mm (Fig. 8). In this setup, the spectra are diffracted and taken by an x-ray glass plate (Ilford Q Plate). Figures 9 show the measured spectra obtained by aluminum electrodes, respectively, at the indicated conditions. Because aluminum $K\alpha$ lines with photon energies of 1.486 keV is as near as the total internal reflecting rays, it was very difficult to distinguish the lines from the reflecting rays. However, we observed high-intensity multiple lines in the lower photon energy region, and the 2.4 μ m aluminum filter transmitted the x rays easily. These lines are not high order diffraction lines because some lines are absorbed easily by the filter.

In the measurement using titanium electrodes, the photon energies (wave lengths) of the lines seldom varied according to changes in the condenser charging voltage, but the line number decreased with decreases in the capillary length.

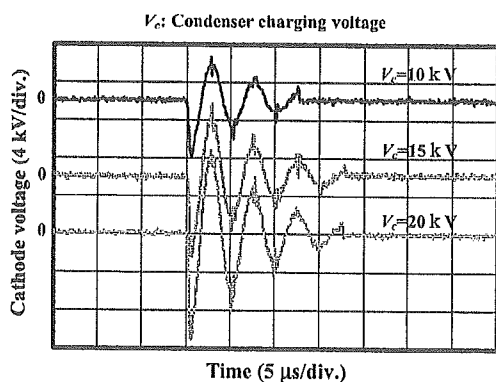


Figure 4: Cathode voltages at the indicated conditions.

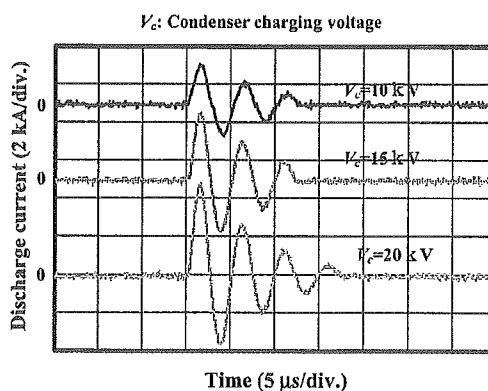


Figure 5: Discharge currents.

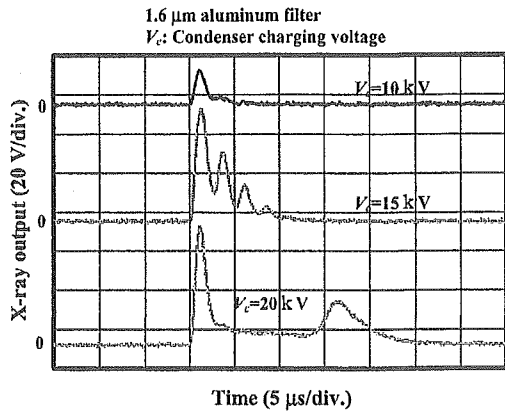


Figure 6: Soft x-ray outputs detected by using 1.6 μm aluminum filter.

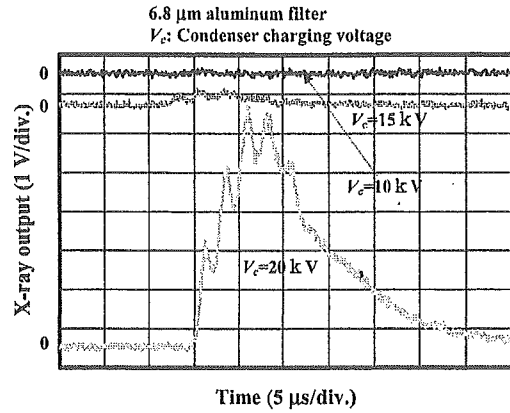


Figure 7: Soft x-ray outputs detected by 6.8 μm aluminum filter.

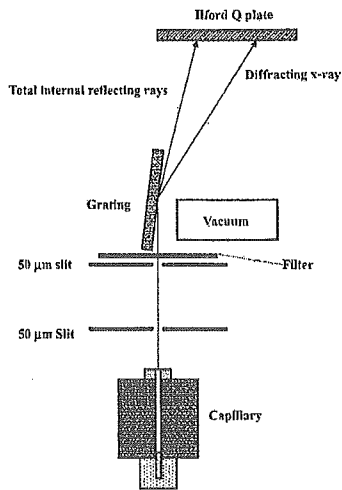


Figure 8: Experimental setup for measuring spectra.

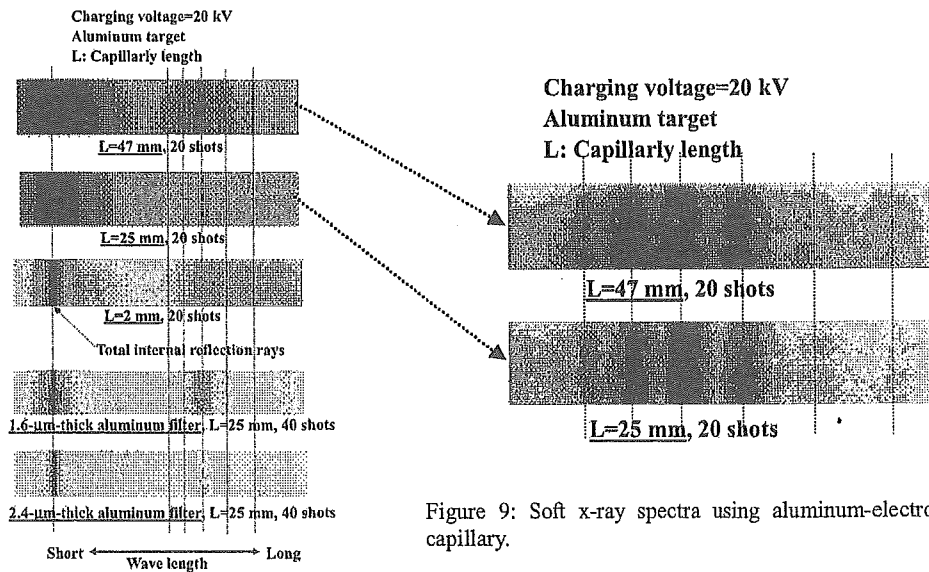


Figure 9: Soft x-ray spectra using aluminum-electrode capillary.

4. DISCUSSION

This flash x-ray generator utilizing a new capillary was primarily designed in order to produce high-intensity characteristic x rays with low photon energies, and we confirmed the multi-line spectra. However, the line photon energies seldom varied according to changes in the electrode element.

In summary concerning the x-ray generation (refer to Fig. 10), when the plasma source forms by the capillary discharge, soft x rays are produced by decreases in the effective electron accelerating voltage caused due to surface discharging.

In the spectrum measurement by a diffraction grating, soft x rays are diffracted based on the following equation:

$$m\lambda = d(\sin \alpha - \sin \beta), \quad m = 1, 2, 3, 4 \dots \quad (1)$$

where λ is the wave length, d is the space between grating lines, α is the incident angle, and β is the diffraction angle. Because the width between lines increases at a low photon energy region, the wavelength may be represented by:

$$\lambda \cong \lambda_0 n^2, \quad n = 1, 2, 3, 4 \dots \quad (2)$$

In the measurement, it is difficult to determine the wave length of λ_0 due to the diffraction efficiency as a function of wave length.

Using this generator utilizing a capillary-type radiation tube, we observed unknown multi-line spectra. Because these lines disappeared following increases in the capillary diameter, clearly the rays are not characteristic x rays.

If we assume that the x-ray resonance without using a resonator is caused by the matching of wave articulation (Fig. 11), the wave length is given by Eq. (2), and x-ray spectra are written as in Fig. 12. In the spectrum measurement, because the incident angle is approximately 2° , the wave length vs the relative distance ($90^\circ - \beta$) on a Q-plate with $m=1$ is represented in Fig. 13.

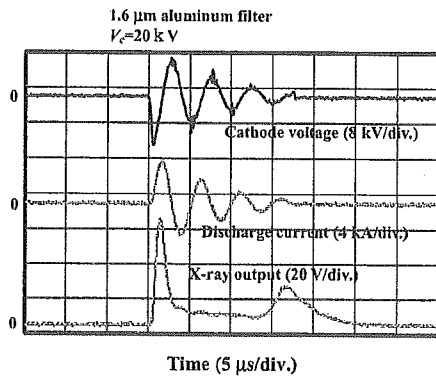


Figure 10: Time relation among cathode voltage, tube current, and x-ray output.

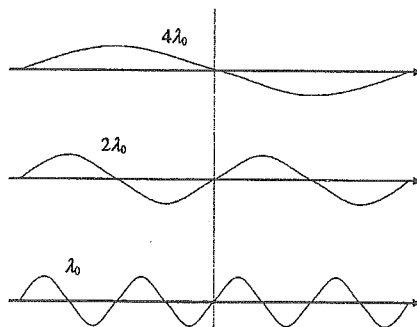


Figure 11: Assumption of hard x-ray resonance without using resonator.

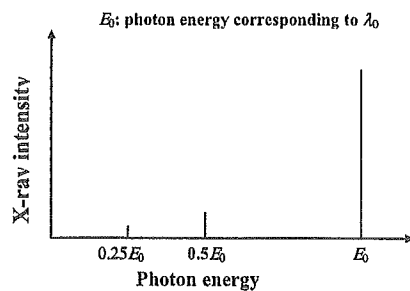
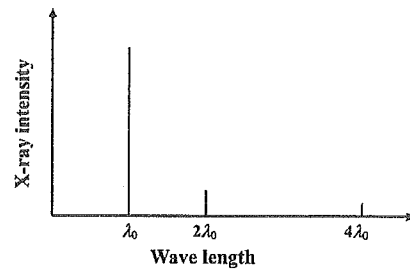


Figure 12: Estimated x-ray spectra under resonance.

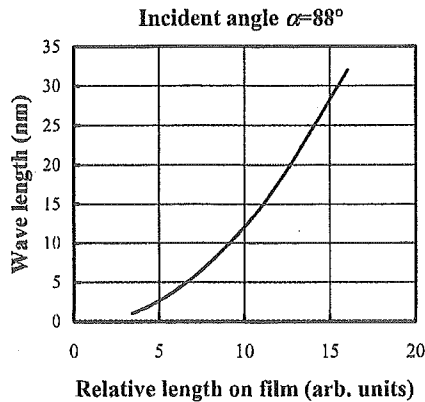


Figure 13: Wave length vs relative length on film.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research (13470154, 13877114, and 16591222) and Advanced Medical Scientific Research from MECSS, Health and Labor Sciences Research Grants (RAMT-nano-001, RHGTEFB-genome-005 and RHGTEFB-saisei-003), Grants from Keiryō Research Foundation, The Promotion and Mutual Aid Corporation for Private Schools of Japan, Japan Science and Technology Agency (JST), and New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO, Industrial Technology Research Grant Program in '03).

REFERENCES

1. R. Germer, "X-ray flash techniques," *J. Phys. E: Sci. Instrum.*, **12**, 336-350, 1979.
2. E. Sato, S. Kimura, S. Kawasaki, H. Isobe, K. Takahashi, Y. Tamakawa and T. Yanagisawa, "Repetitive flash x-ray generator utilizing a simple diode with a new type of energy-selective function," *Rev. Sci. Instrum.*, **61**, 2343-2348, 1990.
3. A. Shikoda, E. Sato, M. Sagae, T. Oizumi, Y. Tamakawa and T. Yanagisawa, "Repetitive flash x-ray generator having a high-durability diode driven by a two-cable-type line pulser," *Rev. Sci. Instrum.*, **65**, 850-856, 1994.
4. E. Sato, K. Takahashi, M. Sagae, S. Kimura, T. Oizumi, Y. Hayasi, Y. Tamakawa and T. Yanagisawa, "Sub-kilohertz flash x-ray generator utilizing a glass-enclosed cold-cathode triode," *Med. & Biol. Eng. & Comput.*, **32**, 289-294, 1994.
5. K. Takahashi, E. Sato, M. Sagae, T. Oizumi, Y. Tamakawa and T. Yanagisawa, "Fundamental study on a long-duration flash x-ray generator with a surface-discharge triode," *Jpn. J. Appl. Phys.*, **33**, 4146-4151, 1994.
6. E. Sato, M. Sagae, A. Shikoda, K. Takahashi, T. Oizumi, M. Yamamoto, A. Takabe, K. Sakamaki, Y. Hayasi, H. Ojima, K. Takayama and Y. Tamakawa, "High-speed soft x-ray techniques," *SPIE*, **2869**, 937-955, 1996.
7. E. Sato, M. Sagae, E. Tanaka, Y. Hayasi, R. Germer, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, S. Sato, K. Takayama and H. Ido: Quasi-monochromatic flash x-ray generator utilizing a disk-cathode molybdenum tube, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **43**, 7324-7328, 2004.
8. E. Sato, Y. Hayasi, R. Germer, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, H. Obara, T. Ichimaru, K. Takayama and H. Ido, "Irradiation of intense characteristic x-rays from weakly ionized linear molybdenum plasma," *Jpn. J. Med. Phys.*, **23**, 123-131, 2003.
9. E. Sato, Y. Hayasi, R. Germer, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, K. Takayama and H. Ido, "Quasi-monochromatic flash x-ray generator utilizing weakly ionized linear copper plasma," *Rev. Sci. Instrum.*, **74**, 5236-5240, 2003.
10. E. Sato, R. Germer, Y. Hayasi, Y. Koorikawa, K. Murakami, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, F. Obata, K. Takahashi, S. Sato, K. Takayama and H. Ido: Weakly ionized plasma flash x-ray generator and its distinctive characteristics. *SPIE*, **5196**, 383-392, 2003.
11. E. Sato, Y. Hayasi, R. Germer, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, S. Sato, K. Takayama and H. Ido, "Sharp characteristic x-ray irradiation from weakly ionized linear plasma," *J. Electron Spectrosc. Related Phenom.*, **137-140**, 713-720, 2004.
12. K. Yoshiaki, A. Nagashima, K. Nagashima, M. Kado, T. Kawachi, N. Hasegawa, M. Tanaka, A. Sasaki and K. Moribayashi, "X-ray lasers driven by optical lasers," *AIP Conference Proc.*, **506**, 613-620, 1999.

13. J.J. Rocca, D.P. Clark, J.L.A. Chilla and V.N. Shlyaptsev, "Energy extraction and achievement of the saturation limit in a discharge-pumped table-top soft x-ray amplifier," *Phys. Rev. Lett.*, **77**, 1476-1479, 1996.
 14. C.D. Macchietto, B.R. Benware and J.J. Rocca, "Generation of millijoule-level soft-x-ray laser pulses at a 4-Hz repetition rate in a highly saturated tabletop capillary discharge amplifier," *Opt. Lett.*, **24**, 1115-1117, 1999.
- *dresato@iwate-med.ac.jp; phone, phone +81-19-651-5111; fax +81-19-654-9282

血管新生療法

竹下 聡

はじめに

血管新生療法 (therapeutic angiogenesis)¹⁾は、血管増殖因子やその遺伝子、あるいは骨髄や末梢血細胞を用いて血管新生を促進させ、組織虚血の改善を図る治療法である。循環器領域における初の遺伝子治療としても知られる vascular endothelial growth factor (VEGF) 遺伝子を用いた血管新生療法が、米国の Isner らによって行われたのは 1994 年のことである²⁾。現在までにすでに 10 年以上が経過し、遺伝子以外にも増殖因子蛋白、骨髄細胞、末梢血細胞などを用いたさまざまな治療が試みられ、その有効性も検証されつつある。各々の治療法の詳細は他稿に譲り、ここでは血管新生療法がどのように生まれ、どのように育ってきたか、その歴史を概説する。

血管新生療法の臨床応用まで

血管新生療法のコンセプトそのものは決して新しいものではない。80 年代後半には、ネコの虚血肢モデルに対して大網の脂質分画を投与し、虚血を改善させる試みが行われている。大網や脂肪細胞の再生医療への応用は最近のトピックであり、このような研究がすでに 20 年近く前に存在したことは興味に値する。これらの血管新生療法と Isner らが行ったそれとの差異は、後者が VEGF という血管内皮細胞に特異的な増殖因子を用いた点にある。90 年代初頭、Isner らは家兎の虚血肢モデルに VEGF 蛋白を投与し、血管新生療法の臨床応用を検討した。動脈投与、静脈投与、繰り返し投与、ヘパリンの併用などさまざまな投与方法を検討し、投与方法のいかに関わらず、側副血行の促進には 100~1000 μg の VEGF 蛋白が必要なことを明らかにした。しかしながら、

大量の VEGF 蛋白を投与すると、投与した蛋白が全身を循環し、非目的部位へと到達するのは避け難い。血管増殖因子の全身への拡散は、糖尿病患者においては網膜症を悪化させ、癌患者では腫瘍血管の発達を促進させる。また、一部の血管増殖因子は NO を介した血管拡張作用を有し、遷延性低血圧を惹起する。事実、VEGF 蛋白を用いた血管新生療法の臨床試験では、低血圧を避けるために投与量が制限された。

大量の蛋白投与に伴う副作用を回避するために行き着いた結論が遺伝子を用いたローカルドラッグデリバリーであった。Isner らはカテーテルを用いて血管細胞へ VEGF 遺伝子を経皮的に導入し、それらの細胞から VEGF 蛋白を分泌させようと考え、表面が親水性ゲルでコーティングされた冠動脈形成術用バルーンカテーテル (ハイドロゲル・バルーンカテーテル) による遺伝子導入を試みた。ハイドロゲルは、狭窄部位におけるバルーン通過性を改善するために施されたコーティングであるが、Isner らはこのゲルにプラスミド DNA の水溶液をしみ込ませ、遺伝子キャリアとして用いた。通常の PTCA テクニックによりバルーンを目的部位へと進め、4~8 気圧で 1 分間バルーンを拡張させることで遺伝子の血管壁への導入が可能であった。その導入効率よりポゾームによる遺伝子導入に比し 100 倍以上の高効率ではあったが、βガラクトシダーゼ遺伝子を用いた組織的検討では、導入部位のわずか 0.1% 以下の細胞にしか遺伝子発現が認められなかった^{3,4)}。このわずかな細胞によって血管新生を促進することが可能なのが問題となるのだが、遺伝子の導入効率 (transfection efficiency) と治療効率 (therapeutic efficiency) とは同義ではない。遺伝子産物である増殖因子が細胞外へと分泌されれば、たとえ導入効率は低くとも、パラクリン効果が期待できる⁵⁾。この仮説は動物実験によって検証された。すなわち、ハイドロゲル・バルーンカテーテルを用いて家兎虚血肢モデルに VEGF 遺伝子の導入を行うと、約 3 週間にわたりその発現が認められ、VEGF 蛋白の動脈内投与と同等以上の側副路発達効果が得られたのである。一方、末梢血中の VEGF 蛋白の濃度は ELISA による測定限界付近にあり、きわめて低値であった。つまり遺伝子の導入効率は低くとも、治療効果を得るに十分な VEGF の局所濃度が維持可能であり、逆に末梢血中濃度は希釈効果によって低く抑えられたのであ

たけした さとし：国立循環器病センター心臓血管内科

る。ここで忘れてならないのは、本法がプラスミド DNA 以外には何らベクターを用いない遺伝子導入法 (naked DNA アプローチ) である点で、臨床応用における高い安全性が期待された。

末梢動脈閉塞症に対する VEGF を用いた血管新生療法

1994 年, Isner らは血管新生療法の臨床試験を開始した²⁾。この臨床試験は、循環器領域における初の遺伝子治療としても知られており、内科治療や外科治療不応性の重症末梢動脈閉塞症患者を対象として行われた。遺伝子治療から 1~2 ヶ月で、血管造影上の新生血管出現が得られ、下肢疼痛や難治性潰瘍が消失した。副作用は下腿浮腫や良性血管腫など、一過性の軽微なものであった。しかしながら、バルーンカテーテルを用いた遺伝子導入は、動脈穿刺が不可能な例、下肢の動脈硬化が高度でカテーテルによるアプローチが困難な例、遺伝子導入に際し解離などの血管損傷リスクが高い例などには施行できない。そこで考案されたのが、虚血筋への遺伝子導入である⁶⁾。Baumgartner らは、VEGF プラスミドの筋注により、7~8 割の症例で血管造影上の側副路発達や臨床症状の改善を得ることに成功した⁷⁾。この遺伝子導入法の単純化により、カテーテルでは治療困難であった症例にも血管新生療法が可能となり、その適応は大きく拡大することとなる。また、本法は心筋へも応用可能であり、虚血性心疾患に対する血管新生療法の臨床応用への契機となった。

虚血性心疾患に対する VEGF を用いた血管新生療法

90 年代後半, Losordo らは胸部小切開法により重症狭心症患者の左室に VEGF プラスミドを筋注し、狭心症状の著明な改善と心筋シンチによる虚血所見の改善を得ることに成功した⁸⁾。さらに Losordo らは、NOGA と呼ばれる心筋マッピングのシステムを用いて、心内膜側から経皮的に VEGF 遺伝子の導入を行い、良好な治療効果を得た⁹⁾。現在、この NOGA システムを用いた経皮的遺伝子治療は、二重盲検試験によって検証中である。最近、類似のプロトコルを用いた臨床試験の結果が Kastrup らにより報告されたが、VEGF 治療群において左室壁運動の改善は認められたものの、自覚症状や心筋シンチ所見の改善は得られていない¹⁰⁾。本法の有効性については、

さらなる検討が必要である。

血管内皮前駆細胞の発見と細胞治療

遺伝子を用いた血管新生療法の臨床応用が進むなか、1997 年, Asahara らはヒト末梢血中の CD34 陽性細胞の分画中に成熟内皮細胞へと分化しうる血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell : EPC) が存在することを明らかにした¹¹⁾。これを契機として、遺伝子や蛋白を中心とした血管新生療法に、細胞移植を用いた血管新生療法の新しい流れが加わった。

EPC は血球血管芽細胞 (ヘマンジオブラスト) と呼ばれる幹細胞より分化するが、成人では通常骨髄中にあり、末梢血中にはきわめてわずかしか存在しない。Kalka らはヒト末梢血単核球から EPC を分離培養し、マウスの虚血肢モデルに投与することで下肢虚血の改善を得た¹²⁾。一方、Shintani らは自己骨髄由来単核球移植によって家兎虚血肢の血管新生が増強することを報告した¹³⁾。移植された自己骨髄単核球が虚血組織における血管形成に参加、もしくは血管増殖因子を放出することで局所の血管新生を刺激したものと思われ、自己骨髄単核球細胞移植による血管新生療法の臨床応用への契機となった。

自己骨髄単核球細胞移植による血管新生療法

末梢動脈閉塞症に対する自己骨髄細胞移植の有効性は、2000 年、国内 3 施設 (久留米大学、関西医科大学、自治医科大学) による Therapeutic Angiogenesis Using Cell Transplantation (TACT) trial において示された¹⁴⁾。全身麻酔下で採取した数百 cc の骨髄液から単核球を分離後、虚血肢に移植することで、ABI (上肢・下肢血流比) は 0.97 ポイント増え、トレッドミル歩行距離は 2.6 倍に改善した。また、下肢疼痛は 9 割、皮膚潰瘍は 8 割の症例で改善した。同様のプロトコルを用いた多施設臨床試験がすでに実施されており、少なくとも本法の短期成績に関しては確立された治療法といっても過言ではない。

末梢血細胞を用いた血管新生療法の臨床応用に関しては、顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony stimulating factor : G-CSF) を用いて末梢血中の単核球から CD34 陽性細胞を分離したり、末梢血単核球細胞移植にアドレノメデュリンの局所投与を併用するなどさまざまな試みがなされている。その有効性に関してはまだ不明な点が多いものの、侵襲性の低さや細胞採取の容易さなど末梢血細胞移植の