



Intensive treatment of risk factors in patients with type-2 diabetes mellitus is associated with improvement of endothelial function coupled with a reduction in the levels of plasma asymmetric dimethylarginine and endogenous inhibitor of nitric oxide synthase

Satoshi Yasuda^{*†}, Shunichi Miyazaki, Munetake Kanda, Yoichi Goto, Masaaki Suzuki, Yutaka Harano, and Hiroshi Nonogi

Division of Cardiology, Department of Medicine, National Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

Received 11 July 2004; revised 20 February 2006; accepted 23 March 2006; online publish-ahead-of-print 20 April 2006

KEYWORDS

Diabetes mellitus;
Endothelium;
Glucose;
Growth substances;
Nitric oxide

Aims Vascular endothelium is a major organ involved in hyperglycaemia and is affected by plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA). ADMA is an endogenous, competitive inhibitor of nitric oxide synthase and is induced by inflammatory cytokines of tumour necrosis factor (TNF)- α *in vitro*. We hypothesized that a tight glycaemic control may restore endothelial function in patients with type-2 diabetes mellitus (DM), in association with modulation of TNF- α and/or reduction of ADMA level.

Methods and results In 24 patients with type-2 DM, the flow-mediated, endothelium-dependent dilation (FMD; %) of brachial arteries during reactive hyperaemia was determined by a high-resolution ultrasound method. Blood samples for glucose, cholesterol, TNF- α , and ADMA analyses were also collected from these patients after fasting. No significant glycaemic or FMD changes were observed in 10 patients receiving the conventional therapy. In 14 patients who were hospitalized and intensively treated, there was a significant decrease in glucose level after the treatment [from 190 ± 55 to 117 ± 21 (mean \pm SD) mg/dL, $P < 0.01$]. After the intensive control of glucose level, FMD increased significantly (from 2.5 ± 0.9 to $7.2 \pm 3.0\%$), accompanied by a significant ($P < 0.01$) decrease in TNF- α (from 29 ± 16 to 11 ± 9 pg/dL) and ADMA (from 4.8 ± 1.5 to 3.5 ± 1.1 μ M/L) levels. The changes in FMD after treatment correlated inversely with those in TNF- α ($R = -0.711$, $P < 0.01$) and ADMA ($R = -0.717$, $P < 0.01$) levels.

Conclusion The intensive correction of hyperglycaemia is associated with the improvement of endothelial function, which is coupled with the decrease in the levels of reduction of plasma TNF- α and ADMA in patients with type-2 DM. A strict glycaemic control may exert anti-cytokine and anti-atherogenic effects and may therefore be pathophysiologically important.

Introduction

Cardiovascular disease is the major cause of morbidity and mortality in patients with type-2 diabetes mellitus (DM),¹ in whom hyperglycaemia is one of the main metabolic abnormalities.² Blood glucose control occupies the centre stage in DM management.³ A recent controlled trial, i.e. the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS), suggested that an intensive glucose-lowering treatment

decreases the occurrence of macrovascular complications.⁴ However, the exact roles of hyperglycaemia and glycaemic control in cardiovascular complications remain to be determined in patients with type-2 DM.

Previous studies demonstrated that acute hyperglycaemia impairs endothelium-dependent vasodilation in healthy subjects,^{5,6} and further depresses it in patients with type-2 DM.⁶ These findings indicate a possible link between glucose level and endothelial function in humans. Endothelial dysfunction is an important phenomenon in the pathogenesis of atherosclerosis⁷ and is related to the derangements of nitric oxide (NO) synthase in the vessel wall.⁸ Asymmetric dimethylarginine (ADMA) is an endogenous, competitive inhibitor of NO synthase.⁹ Its concentration is increased by tumour necrosis

* Corresponding author. Tel: +81 22 717 7153; fax: +81 22 717 7156.

E-mail address: syasuda@cardio.med.tohoku.ac.jp

[†]Present address: Department of Cardiovascular Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine, 1-1 Seiryomachi, Aobaku, Sendai 980-8574, Japan.

factor- α (TNF- α),¹⁰ which is implicated as an important factor in the pathogenesis of type-2 DM.¹¹

Thus, the present study was designed to investigate whether an intensive therapy of hyperglycaemia may improve endothelial function in association with the modulation of the cytokines and/or decrease in plasma ADMA level in patients with type-2 DM.

Methods

Study patients

The study protocol was approved by the Institutional Review board, and all these patients gave their written informed consent to participate in the study. Type-2 DM was defined according to the criteria of the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.¹² Between May 1999 and June 2000, type-2 DM patients with poor glycaemic control [fasting blood glucose >200 mg/dL and/or haemoglobin A-1C (Hb A-1C) >9%] were recruited for intensive treatment of hyperglycaemia during hospitalization. Twenty-four patients were initially assessed for inclusion in the study. Among them, 14 patients [nine men and five women, mean age 61 ± 12 (SD) years] gave their consent and were admitted to the Hospital of the National Cardiovascular Center (intensive treatment group). The remaining 10 patients [seven men and three women, mean age 63 ± 15 (SD) years], who refused to be hospitalized and were obliged to keep conventional (non-intensive) diabetes treatment, served as the control group in the present study.

All the patients underwent history screening, physical examination, and laboratory analysis, including a complete blood count: the levels of plasma electrolyte, glucose, insulin, Hb A-1C, blood urea nitrogen, creatinine, transaminases and urinary protein levels, and lipid profile. Moreover, the patients were assessed for the presence of diabetic complication, i.e. retinopathy, neuropathy, nephropathy, a history of myocardial infarction, and the presence of angina pectoris and arteriosclerosis obliterans. Patients with nephrotic-range proteinuria, thyroid disease, apparent infections, or haematologic, hepatic, or renal disease were excluded from the study. Before admission, five patients had been receiving angiotensin-converting enzyme inhibitors for hypertension and five patients receiving statin for hyperlipidaemia for over 6 months. These medications were not changed throughout the study period. In addition, no new drugs other than insulin or oral hypoglycaemic agents were administered to any of these patients.

Study design

On admission, following an overnight fasting, a non-invasive assessment of brachial arterial vasoreactivity in response to reactive hyperaemia or nitroglycerin was performed with blood sampling for the determination of the levels of glucose, insulin, Hb A-1C, total cholesterol, triglyceride, HDL cholesterol, LDL cholesterol, TNF- α , and ADMA in the plasma. We also measured plasma hepatocyte growth factor (HGF) level. The HGF may protect against endothelial dysfunction, and its production is suppressed by high glucose levels.¹³ Body mass index (BMI) was calculated using the formula BMI = weight (kg)/height² (m²). All measurements were repeated after ~1 month of intensive treatment for hyperglycaemia.

The intensive therapy was aimed at maintaining normal fasting glucose (80–115 mg/dL) and pre-prandial blood glucose (<130 mg/dL) levels. Throughout the study, the patients followed a 1200–1300 Kcal diet regimen of 60–65 g of protein, 30–35 g of fat, and 160–170 g of carbohydrates. The level of dietary cholesterol was 350 g/day. The dose of oral anti-diabetic drugs was adjusted accordingly and/or insulin therapy was administered to

improve glycaemic control. The patients were examined once or twice a week over a 4–5-week period of blood glucose monitoring. None of the patients experienced a hypoglycaemic reaction during the study.

Brachial artery ultrasound

Flow-mediated, endothelium-dependent vasodilation (FMD) following reactive hyperaemia and endothelium-independent nitroglycerin-induced vasodilation of the brachial artery were assessed using a high-resolution ultrasound machine (System Five, General Electronics) equipped with a 7.5 MHz linear array transducer.⁶ After a 10 min rest in a temperature-controlled room (22–23°C), the diameter of the right brachial artery and baseline forearm flow velocity were measured. Increased forearm blood flow was induced by the inflation of a blood pressure cuff placed around the forearm to 200 mmHg or to a pressure of 50 mmHg greater than the systolic blood pressure. This was followed by deflation (RD2 Cuff Deflator, Hokanson Inc., Bellevue, WA, USA) after 5 min. Repeated blood flow scans were obtained to measure the diameter of the brachial artery. After 15 min of vessel recuperation, a repeated measurement of the diameter of the resting brachial artery and repeated blood flow scans were obtained. Sublingual nitroglycerin (0.4 mg) was administered, and then final scans were obtained after 3 min. Throughout the study, a single lead electrocardiogram was obtained, and blood pressure was measured in the left arm every 2 min by an automated blood pressure recorder.

Ultrasound images were recorded on an S-VHS videocassette recorder. Depth and gain settings were used to optimize the images of the lumen-arterial wall interface. Vessel diameter was measured in triplicate at end diastole, from the anterior to the posterior interface between the media and the adventitia. Flow-mediated vasodilation was calculated as the ratio of brachial artery diameter after reactive hyperaemia to baseline diameter and expressed as a per cent increase. Nitroglycerin-mediated vasodilation was calculated in an analogous manner. Volumetric flow rate was calculated by multiplying the time velocity integral of the angle (~70°)-corrected Doppler flow signal by the heart rate and the vessel cross-sectional area. Changes in blood flow were expressed as the percentages of the resting flow measurements. All measurements were performed with the observers blind to patient information and study date. Using this methodology and analysis, the intra- and inter-observer variabilities in brachial artery diameter were 0.03 ± 0.02 (mean \pm SD) and 0.06 ± 0.02 mm, respectively, and the variability in FMD performed on two different days was $1.4 \pm 0.5\%$.

Laboratory measurements

Fasting plasma glucose level was measured by the glucose oxidase method and Hb A-1C level was measured by automated high-performance liquid chromatography. Insulin level was measured by the conventional radioimmunoassay. To assess insulin resistance, we used the following homeostasis model assessment (HOMA) parameters: $HOMA-R = [\text{fasting blood glucose (mg/dL)} \times \text{fasting insulin } (\mu\text{U/mL})] / 405$.¹⁴

Total cholesterol, triglyceride, and HDL cholesterol levels were determined as described previously.¹⁵ LDL cholesterol level was calculated using the Friedewald equation.¹⁶

TNF- α and HGF levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (Otsuka Pharmaceutical Co., Tokushima, Japan). The detection limits of these methods are 2 pg/mL for TNF- α and 0.1 ng/mL for HGF. The intra- and inter-assay coefficients of variation were both ~7% for the enzyme-linked immunosorbent assay.

Plasma ADMA concentration was measured using high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization, as previously described.¹⁷ In brief, equilibrated CBA columns

Table 1 Patient characteristics

	Standard therapy (control), n = 10	Intensive therapy, n = 14	P-value
Age (years), mean \pm SD	63 \pm 15	61 \pm 12	0.7201
Male, n (%)	7 (70%)	9 (64%)	0.7697
Risk factors			
Hypertension, n (%)	5 (50%)	7 (50%)	1.000
Hyperlipidaemia, n (%)	6 (60%)	7 (50%)	0.9448
Smoking, n (%)	4 (40%)	5 (36%)	0.8307
Retinopathy, n (%)	2 (20%)	2 (14%)	0.7111
Proteinuria, n (%)	2 (20%)	4 (29%)	0.6326
CAD, n (%)	2 (20%)	3 (21%)	0.9323
Peripheral artery disease, n (%)	0 (0%)	2 (14%)	0.6175
Stroke, n (%)	1 (10%)	1 (7%)	0.8028
Medications, baseline ^a			
ACE-inhibitor, n (%)	4 (40%)	5 (36%)	0.8307
Calcium blocker, n (%)	2 (20%)	1 (7%)	0.7543
Beta-blocker, n (%)	2 (20%)	1 (7%)	0.7543
Statin, n (%)	6 (60%)	5 (36%)	0.4462
Sulphonylurea, n (%)	7 (70%)	10 (71%)	0.9395
Biguanide, n (%)	1 (10%)	1 (7%)	0.7543
α -Glucosidase inhibitor, n (%)	4 (40%)	2 (14%)	0.3380

ACE, angiotensin-converting enzyme.

^aMedications immediately before additional therapy for dysglycaemia.

(Bond Elut, Varian Inc., CA, USA) were used for three-fold washing with 1 mL serum samples with methanol and distilled water. Thereafter, the samples were eluted with 10% ammonia and dried. The sediment obtained was dissolved in 1 mL of water, the solution was centrifuged, and the supernatant was subjected to high-performance liquid chromatography using ODS columns (Fisher Scientific, St Louis, MO, USA). ADMA concentration was calculated on the basis of the recovery rate of L-monomethyl-arginine (Sigma, St Louis, MO, USA), used as the internal standard. Intra- and inter-assay variabilities were both \sim 6%, with a detection limit of 0.1 μ M/L.

Statistical analyses

Sample size calculations were performed using a primary endpoint variable of FMD. Power calculations indicated that to detect a mean difference in FMD of 4% (SD, 3%), 13 subjects would be needed to complete the study (α statistics, 0.05; power >0.9). All data are expressed as mean \pm SD. Two-tailed *t*-tests or the Mann-Whitney *U*-test was used to compare the changes in response to treatment. To compare the proportions of patients, Fisher's exact test was used. Linear regression curves and correlations were calculated according to the least-squares method. *P*-values less than 0.05 were considered significant.

Results

The baseline characteristics of 10 control patients who received standard therapy and 14 intensively treated patients are summarized in Table 1. All 24 patients completed 3-4-week follow-up measurements.

The control patients were treated by diet alone (three patients) or diet plus oral hypoglycaemic agents (an increased dose of sulphonylurea, six patients and addition of metformin to sulphonylurea, one patient). Table 2 shows no significant improvements in clinical and biochemical parameters during the observation period of 28 \pm 5 days of standard therapy. Neither the fasting blood glucose (from 181 \pm 42 to 186 \pm 38 mg/dL) nor the response of FMD to

Table 2 Changes in biochemical and clinical parameters before and after standard treatment of hyperglycaemia in 10 control patients with type-2 DM

	Before	After	P-value
Hb A-1C (%)	9.4 \pm 2.2	9.4 \pm 2.0	>0.999
Insulin (μ U/mL)	4.2 \pm 2.0	4.4 \pm 2.2	0.834
HOMA-R	1.9 \pm 1.2	1.8 \pm 1.0	0.842
Total cholesterol (mg/dL)	212 \pm 28	210 \pm 25	0.868
TG (mg/dL)	128 \pm 40	129 \pm 45	0.959
HDL cholesterol (mg/dL)	50 \pm 19	51 \pm 20	0.910
LDL cholesterol (mg/dL)	128 \pm 22	127 \pm 25	0.925
Systolic BP (mmHg)	139 \pm 18	138 \pm 20	0.908
Diastolic BP (mmHg)	76 \pm 8	78 \pm 10	0.627
BMI (kg/m ²)	23.8 \pm 2.7	23.4 \pm 3.1	0.763

TG, triglyceride; BP, blood pressure. Values are expressed as mean \pm SD.

reactive hyperaemia (from 3.0 \pm 1.3 to 2.6 \pm 1.0%) changed.

Biochemical and clinical changes after intensive treatment of hyperglycaemia

In the intensive therapy group, the patients were all treated by diet alone (three patients), diet plus oral hypoglycaemic agents (sulphonylurea newly given, one patient; an increased dose of sulphonylurea, one patient; addition of metformin to sulphonylurea, two patients; and addition of α -glucosidase inhibitor to sulphonylurea, one patient), or diet plus insulin (switched from oral hypoglycaemic agents, six patients). The duration of intensive treatment of hyperglycaemia was 34 \pm 13 days. Clinical and biochemical parameters at baseline (before treatment) were similar between the standard therapy group and the intensive therapy group (Tables 2 and 3). After the intensive

Table 3 Changes in biochemical and clinical parameters before and after intensive treatment of hyperglycaemia in 14 patients with type-2 DM

	Before	After	P-value	P-value (vs. control after)
Hb A-1C (%)	9.7 ± 1.6	8.6 ± 1.4	0.032	0.287
Insulin (μU/mL)	4.4 ± 2.6	5.3 ± 2.0	0.314	0.233
HOMA-R	2.0 ± 1.1	1.6 ± 0.5	0.226	0.524
Total cholesterol (mg/dL)	202 ± 33	173 ± 28	0.019	0.003
TG (mg/dL)	121 ± 43	105 ± 51	0.378	0.246
HDL cholesterol (mg/dL)	52 ± 21	52 ± 17	>0.999	0.896
LDL cholesterol (mg/dL)	125 ± 25	101 ± 29	0.027	0.032
Systolic BP (mmHg)	134 ± 18	128 ± 14	0.779	0.1626
Diastolic BP (mmHg)	77 ± 7	74 ± 8	0.301	0.2880
BMI (kg/m ²)	23.6 ± 3.6	21.4 ± 3.2	0.049	0.1405

Values are expressed as mean ± SD.

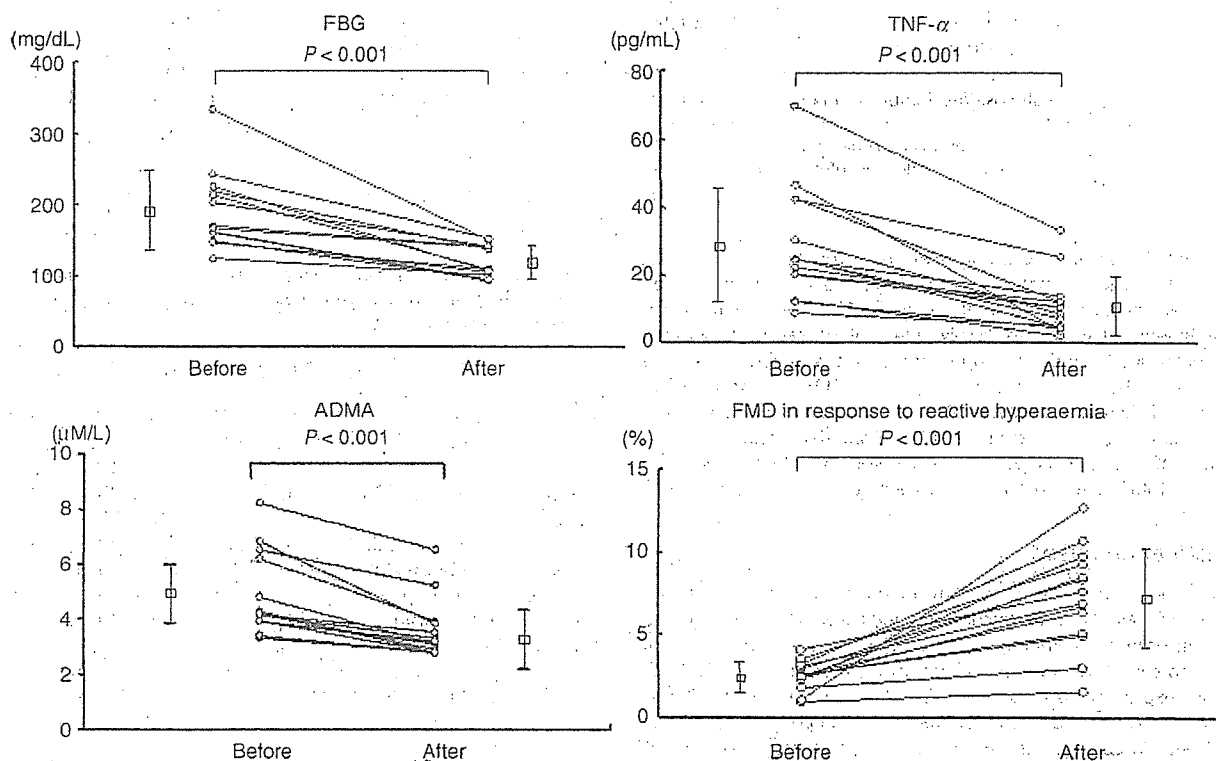


Figure 1 Individual measurements of fasting blood glucose (FBG), TNF-α and ADMA levels, and FMD in response to reactive hyperaemia before and after intensive treatment of hyperglycaemia in 14 patients with type-2 DM.

treatment, the fasting glucose level significantly decreased from 190 ± 55 to 117 ± 21 mg/dL ($P < 0.001$), as shown in Figure 1. Significant decreases in Hb A-1C, total cholesterol, and LDL cholesterol levels and BMI were observed, whereas no changes in HOMA-R index, insulin, triglyceride, or HDL cholesterol levels; and systolic and diastolic blood pressures were observed (Table 3). Two of three patients with coronary artery disease were taking statins at the time of the study.

The levels of plasma TNF-α (from 29 ± 16 to 11 ± 9 pg/dL, $P < 0.001$) and ADMA (from 4.8 ± 1.5 to 3.5 ± 1.1 μM/L, $P < 0.001$) significantly decreased after the intensive control of glucose level (Figure 1). However, HGF level did

not significantly change throughout the study (from 0.19 ± 0.05 to 0.20 ± 0.08 ng/mL).

Brachial artery reactivity after intensive treatment of hyperglycaemia

Before treatment under hyperglycaemic condition, the baseline brachial arterial diameter was 4.5 ± 0.3 mm, and FMD in response to reactive hyperaemia was $2.4 \pm 0.9\%$. After the intensive control of glucose level, FMD significantly ($P < 0.001$) increased to $7.2 \pm 3.1\%$ (Figure 1), whereas the baseline diameter (4.5 ± 0.2 mm) did not change. There was a similar increase in blood flow during reactive

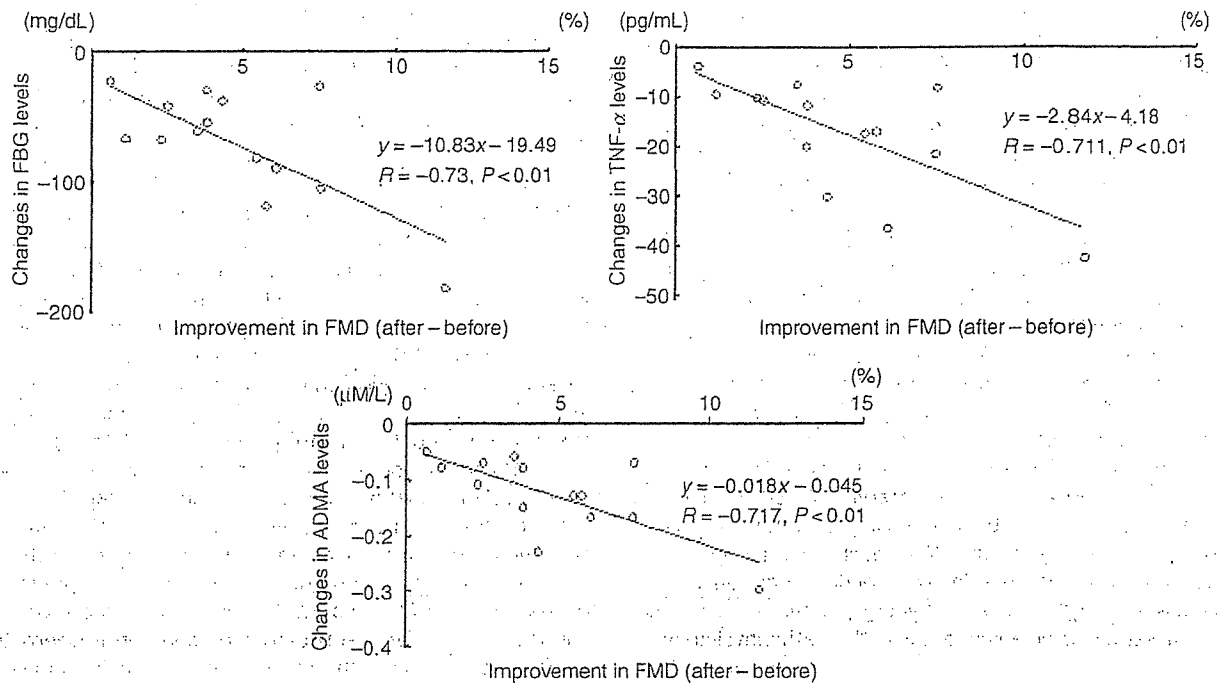


Figure 2 Correlation of improvement of FMD after treatment with decreases in levels of FBG, TNF- α , and ADMA.

hyperaemia (293 ± 16 vs. $296 \pm 20\%$) and a similar baseline heart rate (67 ± 7 vs. 65 ± 8 bpm) before and after the treatment.

Nitroglycerin-mediated vasodilation was $9.8 \pm 1.0\%$ before treatment; however, in contrast to FMD, it did not change after treatment ($10.0 \pm 1.6\%$).

Correlation with FMD improvement

As shown in Figure 2, the improvement of FMD after treatment correlated inversely with the changes in fasting glucose ($R = -0.730, P < 0.01$), TNF- α ($R = -0.711, P < 0.01$), and ADMA ($R = -0.717, P < 0.01$) levels. However, the improvement of FMD did not correlate significantly with the changes in Hb A-1C level ($R = 0.408, P = 0.148$), total cholesterol level ($R = 0.325, P = 0.256$), or BMI ($R = 0.270, P = 0.351$).

Six-to-12-month follow-up

A follow-up study was performed 6–12 months after the discharge. In eight of 14 patients with an Hb A-1C level of $<8.0\%$ at this follow-up period, fasting blood glucose level and FMD remained at 127 ± 26 mg/dL and $8.4 \pm 1.0\%$, respectively. In contrast, in the remaining six patients with an Hb A-1C level of $\geq 8.0\%$, fasting blood glucose level and FMD worsened to be 178 ± 30 mg/dL and $3.1 \pm 1.1\%$, respectively. There were inverse correlations of FMD with fasting blood glucose ($R = -0.577$) and Hb A-1C levels ($R = -0.860$).

Discussion

The major finding in the present study is that the intensive treatment of hyperglycaemia is associated with the improvement of endothelial function, coupled with the

decrease in plasma TNF- α and ADMA (an endogenous inhibitor of NO synthase) levels in patients with type-2 DM.

Previous studies revealed that an acute increase in blood glucose level impairs endothelium-dependent vasodilation in healthy subjects^{5,6} and further inhibits it in patients with type-2 DM.⁶ DM is a state of chronic hyperglycaemia, and glycaemic control is one of the major goals of diabetes management.¹⁸ As shown in Figure 1, endothelial dysfunction improves after a 5-week intervention targeting hyperglycaemia in type-2 diabetes patients, accompanied by a relatively small but significant decrease in Hb A-1C level. In contrast, either hyperglycaemia or endothelial function did not change in control outpatients who received routine treatment. These findings suggest that hyperglycaemia may be a fundamental abnormality underlying the mechanism that causes endothelial dysfunction in DM. However, we must acknowledge a potential limitation that an appropriate control group should have included patients who were admitted to the hospital, but did not receive intensive treatment. In addition, the number of statistical tests performed and relatively small sample size of the study population may potentially infiltrate type-I error.

In patients with type-2 DM, TNF- α levels were elevated in both blood and tissue.^{19–21} Taken together with results from knockout mice deficient in TNF- α or its receptors,¹¹ it is suggested that TNF- α is a factor contributing to the pathogenesis of type-2 DM. Hyperglycaemia is an important stimulus for TNF- α synthesis in human peripheral monocytes *in vitro*.²² A previous *in vivo* study demonstrated that the administration of TNF- α impairs endothelium-dependent vasodilation in rats.²³ In the present study, as shown in Figure 1, plasma TNF- α level decreased after the intensive treatment of hyperglycaemia. This finding indicates the therapeutic potential of a strict glycaemic control against inflammatory cytokines that play a prominent role in atherogenesis.⁷

TNF- α and hyperglycaemia could impair dimethylarginine dimethylaminohydrolase and cause the accumulation of ADMA, an endogenous, competitive inhibitor of NO synthase, contributing to the derangements of NO pathways in the vessel.^{10,24} The intra-arterial infusions of ADMA significantly impair endothelium-dependent flow responses in the human forearm.²⁵ In the present study, we found that the ADMA level increased in patients with type-2 DM (Figure 1), and its decrease after the strict glycaemic control correlated significantly with the improvement of FMD (Figure 2). Not only ADMA, but also TNF- α itself downregulates NO synthase by decreasing mRNA's half-life.²⁶ Moreover, both inflammatory cytokines and high glucose levels enhance the production of oxygen-derived free radicals,^{27,28} which rapidly inactivate NO.²⁹ In patients with type-2 DM, the extent of urinary excretion of the isoprostanes (8-iso-prostaglandin F_{2 α}) significantly decreased \sim 4 weeks after an intensive therapy for hyperglycaemia, an intervention similar to that used in the present study.³⁰ Taking together a recent report that lowering serum TNF- α level alone (without glycaemic control) does not improve endothelial function,³¹ these findings suggest that the hyperglycaemia-induced oxidative stress could be a key factor in the pathophysiology of diabetes.

HGF is characterized to be one of the most potent mitogens among the growth factors for vascular endothelial cells and contributes to vascular protection or repair.¹³ Because its production is suppressed by glucose in a dose-dependent manner *in vitro*,¹³ we hypothesized that endothelial dysfunction might be associated with the decreased production of HGF in diabetic patients. However, this was not the case. The level of HGF did not change throughout this study. Moreover, as shown in Table 3, insulin sensitivity, as assessed using HOMA-R index,¹⁴ did not change significantly. Insulin resistance contributes, in part, to the pathogenesis of type-2 DM and may be potentially linked with endothelial dysfunction and ADMA.³² To address this important issue, we need to further assess insulin sensitivity with a more specific method such as steady-state plasma glucose measurement.

Impaired endothelium is a key factor for diabetic macroangiopathy.⁷ Thus, restoring endothelial function has important clinical implications for reducing the risk of cardiovascular diseases in diabetic patients. The present results, although obtained in a short period, suggest that a long-term maintenance of strict glycaemic control is important. If hyperglycaemia continues, then the expression level of NO synthase and the generation of NO may be chronically reduced, leading to a persistent dysfunction of the vascular endothelium and the consequent atherogenesis. In the UKPDS conducted for more than 15 years,⁴ the difference in Hb A-1C level between the conventionally and intensively treated groups was significant throughout the study. However, Hb A-1C level progressively increased in both groups. The median Hb A-1C level was 6.6% in the first 5 years, but increased to 8.1% in the last 5 years, even in the intensively treated group. A difficulty in maintaining a good glycaemic control may explain, in part, the borderline decrease in the extent of myocardial infarction ($P = 0.05$) induced by the intensive treatment. Taking the multifactorial aetiology of macrovascular disease into account, the results of the UKPDS also suggest that the optimum treatment of patients with type-2 DM would include the control

of blood pressure and correction of lipid abnormalities in addition to the control of glucose level. For the assessment of the effectiveness of therapeutic/dietary interventions and for the early detection of vascular dysfunction, plasma ADMA may be useful as a potential biochemical marker.^{9,33} Metformin,³⁴ angiotensin-converting enzyme inhibitors/angiotensin II receptor blocker,³⁵ and statins³⁶ could decrease ADMA level. Although these drugs were not newly given in the present patients, it is possible that an increased utilization of and compliance with medications and an improved diet during hospitalization may contribute, at least in part, to endothelial function improvement. Insulin-sensitizing rosiglitazone also decreases ADMA level.³⁷ A recent study has suggested that obese and insulin resistance are not strongly associated with the development of type-2 DM in Japanese patients with a BMI of \sim 23 kg/m² (from the Japan Diabetes Complications Study), unlike in European patients with a BMI of \sim 29 kg/m² (from the UKPDS).³⁸

In conclusion, in patients with type-2 DM, the intensive treatment of hyperglycaemia is associated with the improvement of endothelial dysfunction, coupled with decreases in TNF- α and ADMA levels. A strict glycaemic control may exert anti-cytokine and anti-atherogenic effects and may therefore be pathophysiologically important.

Acknowledgement

This study was supported partly by a grant for Clinical Vascular Function from Kimura Memorial Foundation (Fukuoka, Japan) and by the Promotion of Fundamental Studies in Health Science of the Organization for Pharmaceutical Safety and Research of Japan (Tokyo, Japan).

Conflict of interest: none declared.

References

- Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998;339:229-234.
- Capes SE, Hunt D, Malmberg K, Gerstein HC. Stress hyperglycaemia and increased risk of death after myocardial infarction in patients with and without diabetes: a systematic overview. *Lancet* 2000;355:773-778.
- Grundy SM, Benjamin EJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, Mitch W, Smith SC Jr, Sowers JR. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 1999;100:1134-1146.
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998;352:837-853.
- Williams SB, Goldfine AB, Timimi FK, Ting HH, Roddy MA, Simonson DC, Creager MA. Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans *in vivo*. *Circulation* 1998;97:1695-1701.
- Kawano H, Motoyama T, Hirashima O, Hirai N, Miyao Y, Sakamoto T, Kugiyama K, Ogawa H, Yasue H. Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:146-154.
- Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126.
- Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 1997;100:2153-2157.
- Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2032-2037.

10. Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999;99:3092-3095.
11. Moller DE. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:212-217.
12. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1997;20:1183-1197.
13. Morishita R, Nakamura S, Nakamura Y, Aoki M, Moriguchi A, Kida I, Yo Y, Matsumoto K, Nakamura T, Higaki J, Ogihara T. Potential role of an endothelium-specific growth factor, hepatocyte growth factor, on endothelial damage in diabetes. *Diabetes* 1997;46:138-142.
14. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-419.
15. Shinozaki K, Suzuki M, Ikebuchi M, Takaki H, Hara Y, Tsushima M, Harano Y. Insulin resistance associated with compensatory hyperinsulinemia as an independent risk factor for vasospastic angina. *Circulation* 1995;92:1749-1757.
16. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
17. Pettersson A, Uggla L, Backman V. Determination of dimethylated arginines in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997;692:257-262.
18. Keen H, Clark C, Laakso M. Reducing the burden of diabetes: managing cardiovascular disease. *Diabetes Metab Res Rev* 1999;15:186-196.
19. Winkler G, Salamon F, Harmos G, Salamon D, Speer G, Szekeres O, Hajos P, Kovacs M, Simon K, Cseh K. Elevated serum tumor necrosis factor-alpha concentrations and bioactivity in type 2 diabetics and patients with android type obesity. *Diabetes Res Clin Pract* 1998;42(Suppl.):169-174.
20. Zinman B, Hanley AJ, Harris SB, Kwan J, Fantus IG. Circulating tumor necrosis factor-alpha concentrations in a native Canadian population with high rates of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:272-278.
21. Clausell N, Kalil P, Biolo A, Molossi S, Azevedo M. Increased expression of tumor necrosis factor-alpha in diabetic macrovasculopathy. *Cardiovasc Pathol* 1999;8:145-151.
22. Morohoshi M, Fujisawa K, Uchimura I, Numano F. Glucose-dependent interleukin 6 and tumor necrosis factor production by human peripheral blood monocytes *in vitro*. *Diabetes* 1996;45:954-959.
23. Wang P, Ba ZF, Chaudry IH. Administration of tumor necrosis factor-alpha *in vivo* depresses endothelium-dependent relaxation. *Am J Physiol* 1994;266:H2535-H2541.
24. Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Tsuji H, Reaven GM, Cooke JP. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 2002;106:987-992.
25. Calver A, Collier J, Leone A, Moncada S, Vallance P. Effect of local intra-arterial asymmetric dimethylarginine (ADMA) on the forearm arterial bed of healthy volunteers. *J Hum Hypertens* 1993;7:193-194.
26. Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC Jr, Lee ME. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res* 1993;73:205-209.
27. Matsubara T, Ziff M. Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *J Immunol* 1986;137:3295-3298.
28. Marfella R, Quagliaro L, Nappo F, Ceriello A, Giugliano D. Acute hyperglycemia induces an oxidative stress in healthy subjects. *J Clin Invest* 2001;108:635-636.
29. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986;320:454-456.
30. Davi G, Ciabattoni G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S, Pennese E, Vitacolonna E, Bucciarelli T, Costantini F, Capani F, Patrono C. *In vivo* formation of 8-iso-prostaglandin f2alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation* 1999;99:224-229.
31. Bilsborough W, O'Driscoll G, Stanton K, Weerasooriya R, Dembo L, Taylor R, Green D. Effect of lowering tumor necrosis factor-alpha on vascular endothelial function in type II diabetes. *Clin Sci* 2002;103:163-169.
32. Nash DT. Insulin resistance, ADMA levels, and cardiovascular disease. *JAMA* 2002;287:1451-1452.
33. Fard A, Tuck CH, Donis JA, Sciacca R, Di Tullio MR, Wu HD, Bryant TA, Chen NT, Torres-Tamayo M, Ramasamy R, Berglund L, Ginsberg HN, Honma S, Cannon PJ. Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2039-2044.
34. Asagami T, Abbasi F, Stuefeling M, Lamendola C, McLaughlin T, Cooke JP, Reaven GM, Tsao PS. Metformin treatment lowers asymmetric dimethylarginine concentrations in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 2002;51:843-846.
35. Delles C, Schneider MP, John S, Gekle M, Schmieder RE. Angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin II AT1-receptor blockade reduce the levels of asymmetrical N(G), N(G)-dimethylarginine in human essential hypertension. *Am J Hypertens* 2002;15:590-593.
36. Lu TM, Ding YA, Leu HB, Yin WH, Sheu WH, Chu KM. Effect of rosuvastatin on plasma levels of asymmetric dimethylarginine in patients with hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 2004;94:157-161.
37. Stuhlinger MC, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP, Reaven GM, Tsao PS. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA* 2002;287:1420-1426.
38. Sone H, Ito H, Ohashi Y, Akanuma Y, Yamada N, Japan Diabetes Complication Study Group. Obesity and type 2 diabetes in Japanese patients. *Lancet* 2003;361:85.

<班研究紹介シリーズ>

脳卒中に対する再生医療的技術を用いた治療法の開発に関する研究

田口 明彦¹⁾ 明神 和紀¹⁾ 松山 知弘²⁾

循環器病研究委託事業 (16公-7)

「脳卒中、脳血管性痴呆症に対する再生医療技術を用いた治療法の開発に関する研究」班

<研究組織>

代表研究者

田口 明彦 国立循環器病センター

分担研究者

出澤 真理	京都大学医科学研究科	西村 浩美	先端医療振興財団
松山 知弘	兵庫医科大学医学部	林 拓也	国立循環器病センター
飯田 秀博	国立循環器病センター	植田 初江	国立循環器病センター

Key words: 脳梗塞, 再生医療

(脳卒中 28:433—436, 2006)

緒 言

現在わが国においては、他の諸国においては類を見ないほどの急速な高齢化社会を迎えており、脳梗塞後遺症や血管性痴呆症に起因する要介護者の急激な増加は、日本の社会構造を根底から揺るがす極めて深刻な社会問題となっている。これらの疾患に対し様々な研究が積み重ねられてきたが、脳梗塞に対する確立された治療法は発症後数時間以内の血栓溶解療法以外になく、脳血管性痴呆に対しては全く有効な治療手段がないのが現状である。

近年、今までの医療では治療できなかった難治性の虚血性循環器疾患に対して、再生医療的手法を用いた治療法が開始され、虚血性心疾患や末梢動脈閉塞症に対しては著しい治療効果が報告されている。しかし、脳障害に対する治療法はほとんど進歩が見られていないのが現状であり、基礎研究レベルにおいても、ES細胞あるいは胎児由来の神経幹細胞を用いた研究が盛んに行われてきたが、それらの単なる移植では神経細

胞として脳内で生着、成熟し機能することが困難であることが明らかになりつつある。

我々は胎生期や成体における神経発生や神経再生において、神経幹細胞の分化や成熟、機能は、常に血管新生とともにプログラムされていることに着目し研究を行ってきたが、本研究班では①脳梗塞治療を目的とした、脳血管再生および神経細胞再生を含む脳組織再生、機能再生による治療法の確立に向けた研究、および②脳梗塞予防を目的とした、脳血管再生による治療法の確立に向けた研究、を行っており、本総説においてその研究経過を概説します。

A. 脳梗塞治療を目的とした、脳血管再生および神経細胞再生を含む脳組織再生、機能再生による治療法の確立に向けた研究

1. 再現性の非常に高いマウス脳梗塞モデルの作成: 松山, 田口

脳梗塞に対する新しい治療法の効果検定には、再現性の高い動物モデルが必要不可欠であるが、既存のげっ歯類脳梗塞動物モデルはその脳梗塞発症部位およびサイズの再現性が低く、かつ脳梗塞後の生存率に大きな問題を抱えていた。そのため、治療効果の判定には一過性脳虚血モデルが広く用いられてきたが、一過

¹⁾国立循環器病センター研究所循環動態機能部

²⁾兵庫医科大学医学部先端医学研究所

(2006年9月11日受付, 2006年9月16日受理)

性脳虚血後に生じる神経細胞の脱落は、脳梗塞患者における神経組織壊死と病態的に大きく解離しているため、脳梗塞治療効果の検定には適当でない場合が多く、過去に一過性脳虚血モデルで有効とされた薬剤の臨床試験では、ほとんどのものが無効あるいは有害であった。そのため当研究班ではまず、再現性および生存率の高いげっ歯類脳梗塞モデルの確立に向けた検討を行った。様々な手法と種々のマウスおよびラットのstrainの検討を行った結果、SCID (Sever Combined Immunodeficiency) マウスの中大脳動脈のM1 distal部位を直視下で結紮することにより、中大脳動脈灌流領域の皮質部位に常に一定の脳梗塞を生じる非常に再現性の高い脳梗塞動物モデルの作成に成功した¹⁾。この脳梗塞モデルにおいては形態学および組織学的にも常に同一の脳梗塞が作成されるだけでなく、神経学的にも均一な症状を呈することより、今後の新しい脳卒中治療法の開発に非常に有用な実験モデルとして、広く使用可能であると考えている。

2. 血管血球系幹細胞投与による脳血管再生, 神経再生の誘導: 松山, 明神, 田口

我々が新しく開発した非常に再現性の高い脳梗塞モデルを用いて、脳梗塞後の骨髄系単核球細胞投与の治療効果およびその機序に関する検討を行った。

左中大脳動脈閉塞48時間後の脳梗塞マウスを用いて、骨髄系単核球細胞の分画であるCD34陽性細胞を尾静脈より単回投与し、骨髄系単核球細胞投与による①血管再生の促進効果、②内因性の神経再生促進効果、③脳組織再生効果および④神経機能再生効果に関して検討を行った。その結果、①脳梗塞後の骨髄系単核球細胞投与は梗塞周囲における主に内因性の血管再生を促進し、血流の再建を誘導する、②脳梗塞後の血管再生は内因性の神経再生を誘導するだけでなく、その生着に必須である、③骨髄系単核球細胞投与による脳梗塞後の血管再生は、脳神経組織の再生を誘導する、④脳梗塞後の血管再生による脳組織再生は脳機能の再生をもたらす、ことを世界に先駆けて明らかにしてきた¹⁾。

また骨髄単核球の末梢血中への動員を目的としてG-CSFの投与を行ったが、治療効果とは逆にG-CSFの投与により脳萎縮の進行が観察された。さらに、細胞処理過程の簡略化を目的として、骨髄細胞の投与実験を行ったが、G-CSFと同様に脳萎縮の進行が観察された。これらの結果は、①G-CSFで動員される顆粒球には負的作用が有ること、および②骨髄細胞中の骨髄

単核球細胞分画を精製する必要があること、を示唆しており、これまでの報告における顆粒球細胞の脳梗塞巣に対する障害作用²⁾とも合致すると考えている。

一方、脳梗塞後の血管構築に関する詳細な検討のため、放射光X線を用いた研究を行った。正常血管解剖としては脳表に分布する動脈から大脳灰白質を栄養する直径10 μ m程度のPerforating Arteryが明瞭に描出されたが³⁾、脳梗塞後の未治療群では脳梗塞大脳半球は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、対側と比較してやや拡張や蛇行があるもののPerforatorが撮像されており、機能血管が残存していた。また、梗塞巣周囲における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おいてPerforatorよりもさらに微細な血管の増生が観察されたが、これらは移植により誘導された再生血管であり、これら再生血管が梗塞巣への側副路となり、梗塞巣へ血液を供給していると考えている。

3. 霊長類脳梗塞モデルにおける自己骨髄単核球投与: 林, 明神, 田口

ヒト⁴⁾やマウス⁵⁾と同様にサルにおいても神経幹細胞が存在すること⁶⁾、さらには脳梗塞後に神経幹細胞などによる修復過程⁷⁾が存在することが知られているが、本検討では霊長類における脳梗塞後の骨髄採取およびその静脈内投与に関する安全性の検討を行った。

我々の予定している臨床試験では、対象疾患を心原性脳塞栓症患者としているため、当動物実験モデルにおいてもヒト病態に近い自己血栓によるカニクイザル塞栓モデルの作成を行った。全身麻酔下において血管撮像装置を使用し、超選択的カテーテル法により自己血栓を中大脳動脈M1遠位部より投与することにより、中大脳動脈領域の脳梗塞を作成し、脳梗塞の確認はMRIを用いて行った。脳梗塞作成後7日後に腸骨骨髄より骨髄液の採取(10ml)を採取し、静脈より自己骨髄由来単核球細胞の投与を行った。安全性の検査項目として①検血、②神経症状の悪化、③MRIによる出血および再梗塞の評価を行い、最長脳梗塞12カ月以降まで経過観察を行ったが、脳梗塞後の骨髄採取およびその静脈内投与によると考えられる有害事象は認められなかった。

4. 脳梗塞患者における再生機転の病的検討: 植田

以上のような脳梗塞動物モデルで得られた知見が、

幹細胞を慢性脳虚血患者に投与する前臨床試験には、本モデルでの検討は必須であると考えている。

総 括

我々は末梢動脈閉塞症患者に自己骨髄由来の血管血球系幹細胞を移植することにより虚血症状の改善することを示してきたが¹⁾、脳虚血動物モデルにおいても、血管血球系幹細胞の移植が、既存小血管の保護や微小血管網の再生、再構築を介して神経機能の改善をもたらすことを明らかにした。これらの知見は、急性期脳梗塞患者に対する血管血球系幹細胞移植の可能性を示唆するものであり、霊長類を用いた検討や脳梗塞患者における病理的所見を総合して、脳梗塞患者に対する新しい治療法の確立に向けたプロトコル作りを行っている。

また、脳梗塞予防に関する研究では末梢血中の CD34 陽性細胞や CD133 陽性細胞などの血管血球系幹細胞の減少が、脳梗塞の発症と強く関連しているだけでなく、Blood Brain Barrier を形成する血管内皮細胞の機能、神経組織の代謝およびその機能にまで影響を与えていることを我々は明らかにしており、血管血球系幹細胞の補充による新しい治療法の可能性を示唆していると考えている。

参考文献

- 1) Taguchi A, Soma T, Tanaka H, et al: Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest* 114: 330—338, 2004
- 2) Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, et al: Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. *Effects of neutrophil depletion. Stroke* 25: 1469—1475, 1994
- 3) Myojin K, Taguchi A, Umetani K, et al: Visualization of intracerebral arteries by synchrotron radiation microangiography. *American Journal of Neuroradiology* In press
- 4) Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, et al: Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4: 1313—1317, 1998
- 5) Arvidsson A, Collin T, Kirik D, et al: Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8: 963—970, 2002
- 6) Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, et al: Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 286: 548—552, 1999
- 7) Tonchev AB, Yamashima T, Zhao L, et al: Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys. *Mol Cell Neurosci* 23: 292—301, 2003
- 8) Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, et al: Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest* 113: 1701—1710, 2004
- 9) Mimura T, Dezawa M, Kanno H, et al: Behavioral and histological evaluation of a focal cerebral infarction rat model transplanted with neurons induced from bone marrow stromal cells. *J Neuro-pathol Exp Neurol* 64: 1108—1117, 2005
- 10) Taguchi A, Matsuyama T, Moriwaki H, et al: Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function. *Circulation* 109: 2972—2975, 2004
- 11) Taguchi A, Ohtani M, Soma T, et al: Therapeutic angiogenesis by autologous bone-marrow transplantation in a general hospital setting. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 25: 276—278, 2003

脳梗塞患者にでも実際に起こっているかを検討するために、脳梗塞患者における病理標本を用いて脳梗塞後の血管新生及び神経再生に関する検討を行った。その結果、梗塞周囲領域における血管再生が観察されるとともに、Musashi-1 陽性の神経幹細胞と考えられる細胞群を同定した。これらの細胞群は脳梗塞発症後比較的早期から発現しているものの、30日ごろにはかなり減少し、90日にはほとんど見られなくなった。これらの所見は脳梗塞後の内因性の組織修復機構を用いた治療法の開発には、脳梗塞発症後30日以内をターゲットにすべきであることを示唆していると考えている。

5. 成体由来の神経幹細胞の確立：出澤

血管再生を基盤とした内因性の神経再生誘導に関する治療法を、より効果的な治療法として発展させるために、神経幹細胞の樹立及びその投与による治療法の開発を行っている。本研究では骨髄間質細胞からの神経細胞への誘導を試み、最終分裂を終えた機能的な神経細胞を非常に高い効率で、しかも選択的に誘導する方法を開発した⁹⁾。最初に、ヒトおよびラットの骨髄間質細胞においてNotch遺伝子を導入することによって神経幹細胞様に分化転換することを見いだしたが、これらの細胞は神経幹細胞に特異的なマーカー(GLAST, 3-PGDH, nestin)を発現し promoter 解析においてもそれらの因子の活性の有意な上昇が観察された。神経幹細胞様に分化転換した細胞にサイトカイン刺激(bFGF, Forskolin, CNTF)を与えると非常に効率の高い選択的な神経誘導が引き起こされ、またこの最終産物にはグリア細胞が一切含まれておらず、神経細胞だけで最終産物が構成されていることを明らかにした。誘導された神経細胞はパッチクランプ実験において機能的な神経細胞であることが確認された。誘導された神経細胞にさらにGDNFを投与するとドーパミン作動性ニューロンが40%近くに増加し、これらの細胞をパーキンソンモデルラットの線状体に移植したところ、apomorphin 誘導の回転運動や paw reaching test, adjusting step test において顕著な症状改善を認めた。また、骨髄間質細胞由来の神経幹細胞の脳梗塞巣への移植を行った結果、量的には少ないものの移植神経幹細胞の生着、および神経機能の向上が観察された⁹⁾。骨髄間質細胞由来神経幹細胞は移植治療において多くの利点を有し、血管再生などと組み合わせることにより生着率の向上を図ることにより、患者への適応の可能性が期待されると考えている。

B. 脳梗塞予防を目的とした脳血管再生による治療法の確立に向けた研究

1. 末梢血中幹細胞の低下と脳神経機能の低下および虚血性疾患の発症に関する検討：田口, 松山, 林
血管内皮前駆細胞系の幹細胞を多く含むCD34, CD133 抗原陽性細胞数の減少が、脳梗塞巣の増加と有意に関連している一方、血管内皮前駆細胞と関連の弱いCD117 抗原およびCD135 抗原細胞数との有意な関連は見られなかった¹⁰⁾。さらに、脳主幹動脈閉塞あるいは高度狭窄のある患者のPETを使った検討ではCD34, CD133 抗原陽性細胞数の減少が、慢性虚血部位の脳血流量の低下に有意に関連しており、側副血行路の形成低下や血管反応性の低下など、血流血管維持機構の低下と関連していると考えられた。CD34 抗原陽性細胞数減少患者においては、慢性虚血部位における酸素摂取率の反応性の上昇は認められず、その結果酸素代謝量の低下が認められた。さらに、脳梗塞患者において末梢血中のCD34 陽性細胞が減少している群においては、MMSE で評価される認知機能およびCDR で評価される認知症の重症度が高いことを明らかにした。また、虚血性疾患のリスクが非常に高い患者においては、CD34 陽性細胞減少群においてその後の虚血性疾患の発症が高いことを明らかにした。これらの結果は、末梢血中血管血球系幹細胞の低下が血管内皮機能の低下と共に神経機能の低下にも関連していることを示しており“血管血球系幹細胞の補充”により虚血性疾患が予防できる可能性を示唆していると考えている。

2. 血管血球系幹細胞の生体外増殖：西村

ヒト臍帯血よりCD133 陽性細胞を単離後、VEGF, SCF, TPO 等の最適化された growth factor を加えることにより、7日間の無血清培養により50~80倍程度に増殖させることに成功した。これらの増殖細胞は血管内皮系コロニー形成能が保たれているとともに、虚血性心疾患モデルにおいても、心機能回復能を確認した。これらの手法は、患者由来の末梢血/骨髄由来血管血球系幹細胞でも可能であると考えており、臨床応用に向けた、展開が大きく開けたと考えている。

3. 霊長類における慢性期脳虚血モデルの作成：飯田, 林

げっ歯類においても慢性脳虚血モデルは存在しなかったが、飯田, 林らは霊長類において慢性脳虚血モデルの作成に成功した。生体外増殖された血管血球系

動脈疾患 閉塞性動脈硬化症

竹下 聡*
たけした さとし

- 閉塞性動脈硬化症は quality of life への影響は大きいですが、生命予後に対する影響は小さい。
- 閉塞性動脈硬化症患者の生命予後は、合併する動脈硬化性疾患によって規定される。
- 閉塞性動脈硬化症の早期発見によって、動脈硬化の危険因子コントロールを早期に開始し、虚血性心疾患や脳血管疾患の予防へと結びつけることが肝要である。

Key Words ABPI, Fontaine 分類, 血管超音波検査, 近赤外線分光法

はじめに

人は血管とともに老いると言われるように、動脈硬化は加齢とともに進行する。この進行に影響を与えるのが、糖尿病、高脂血症、高血圧、喫煙などの動脈硬化性危険因子である。これらの危険因子を治療することによって、狭心症や心筋梗塞などの動脈硬化性疾患の進行を阻止することが可能である。これは閉塞性動脈硬化症においても同様で、より早期に発見し危険因子のコントロールを開始することが患者予後の改善において肝要である。

閉塞性動脈硬化症とは

従来、閉塞性動脈硬化症はわが国では少なく、同じ末梢動脈閉塞疾患である Buerger 病が多数を占めるとされていた。しかしながら、食生活の欧米化とともに閉塞性動脈硬化症が増加し、Buerger 病の占める割合は次第に減少してきた。

わが国における閉塞性動脈硬化症の発生頻度については、大規模な疫学データが存在しないため詳細は不明であるが、欧米における罹患率は人口の数パーセント程度とされている¹⁾。

閉塞性動脈硬化症では、末梢動脈の粥状動脈硬化によって血管内腔の狭窄が進行し、下肢虚血が生じる。これにともない、しびれ、冷感、間歇性跛行、疼痛、潰瘍、壊疽などのさまざまな症状が出現する。自覚症状による病期分類としては Fontaine 分類が代表的である (表 1)。Fontaine

表 1 Fontaine 分類

グレード	症状
I	無症状
II	間歇性跛行
III	安静時疼痛
IV	皮膚潰瘍, 壊疽

I 度の軽症 (無症状) 患者に対しては、禁煙指導を行ったり、糖尿病・高血圧など動脈硬化の危険因子コントロールを行いながら経過を観察する。病状が進行してくると、Fontaine II 度に見られるような間歇性跛行が出現する。間歇性跛行とは、一定距離の歩行後に下肢の疼痛が出現するが、休息により痛みは一時的に消失し、再び歩行することによって再出現するといった特徴的な症状をいう。閉塞性動脈硬化症でもっとも多い症状は、この間歇性跛行である。間歇性跛行が軽度の場合、運動療法や抗血小板剤などによる薬物療法を行うが、重症例では狭窄した血管をカテーテルによって拡張する経皮的血管形成術 (percutaneous transluminal angioplasty: PTA) や外科手術 (バイパス手術) による血行再建が必要となる。Fontaine III~IV 度を重症下肢虚血 (critical limb ischemia: CLI) と呼ぶ。このような状態にまで進行すると、安静時にも下肢疼痛が出現し、皮膚潰瘍や壊疽も見られるようになる。重症下肢虚血を呈する患者では、痛みや壊疽のために運動療法を施行するのは困難で、薬物治療に対する反応性も

* 国立循環器病センター 心臓血管内科

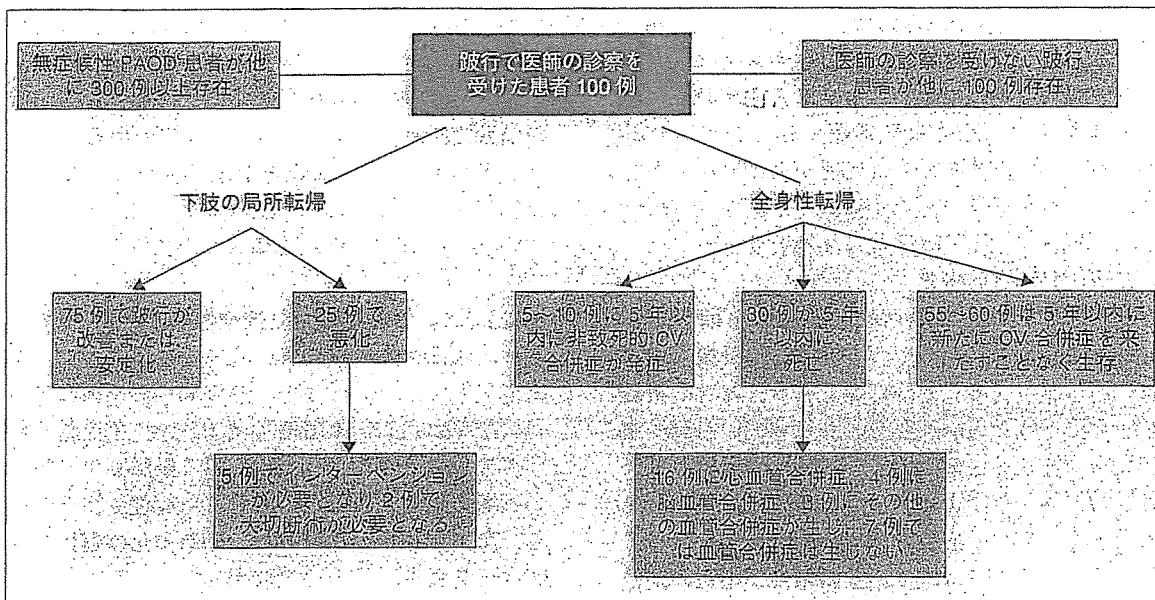


図1・跛行患者の5年間の経過

(文献1日本語訳：日本脈管学会編：下肢閉塞性動脈硬化症の診断・治療指針 日本語版，p.21，2000より引用)

低い。また、重症下肢虚血をきたすような血管は動脈硬化が高度で、血管形成術やバイパス手術の適応にならないことも少なくない。このような重症例に対しては血管新生療法 (therapeutic angiogenesis²⁾) が考慮されることになる。

閉塞性動脈硬化症の早期発見

動脈硬化を原因とする疾患として、閉塞性動脈硬化症以外に心筋梗塞などの冠動脈疾患、脳梗塞などの脳血管疾患などさまざまな循環器疾患があげられる。心筋梗塞や脳梗塞が生命に関わるような重篤な疾患であるのに対し、閉塞性動脈硬化症は主に quality of life へ関与するため、その早期発見に対する医療従事者の関心は、冠動脈疾患などのそれに比べて低い。

閉塞性動脈硬化症の大部分は、Fontaine II 度の間歇性跛行患者で占められる。Fontaine II 度の閉塞性動脈硬化症が進行し、下肢血管に対する血行再建術や下肢切断術が必要となる確率は5年間で10%以下である。一方、これらの患者が、冠動脈疾患や脳血管疾患で死亡する確率は20%以上と比べて高い (図1)¹⁾。すなわち、閉塞性動脈硬化症患者の早期発見は、閉塞性動脈硬化症の進展阻止よりも、むしろ他の心血管合併症を阻止す

る意味において重要である。また、Fontaine I 度の無症状患者は、間歇性跛行例の3倍以上存在し (図1)¹⁾、潜在する無症候症患者をいかに見つけるか大きな課題といえる。

Vascular Lab

バスキュラーラボ (vascular lab：血管検査室) は、血管疾患の診断を行うためのさまざまな無侵襲検査装置を集約した検査室である。診断装置には四肢血圧脈波測定装置、末梢血管診断装置 (バソガード)、超音波診断装置、近赤外分光法、トレッドミルなどがある。DSA や CT-angiography などの診断法との大きな違いは、血管疾患の画像診断だけでなく、血管の機能評価も行える点にある。

1. 上腕・足関節血圧比 (ABPI)

上腕・足関節血圧比 (ankle-brachial pressure index：ABPI) は、上肢と下肢の収縮期血圧の比から末梢動脈病変の有無を推定する基本指標である。四肢血圧脈波測定装置、末梢血管診断装置 (バソガード)、ドプラ血流計などを用いて測定する。上肢収縮期血圧は上腕動脈または橈骨動脈で、下肢収縮期血圧は足背動脈または後頸骨動脈で求め、下肢血圧の上肢血圧に対する比を算出する。

0.9未満を異常値とするが、ABPIの低下は早期より認められるため、無症状例の早期発見に有用である。閉塞性動脈硬化症に対するABPIの診断感度と特異度はともに90%を超えるとされているが、慢性透析症例などでは血管が高度に石灰化しているためABPIが低下しない（下肢血圧が高値となる）ので、その評価には注意を要する。

2. 血管超音波検査

血管超音波検査は末梢動脈疾患の早期診断にもっとも有用な検査の1つである。無侵襲なので繰り返し施行することが可能である。血管の断層像、血流速度、血流波形などから病変の有無や重症度を判断する。最近の機器では、カラードプラ法を用いることによって、きわめて良好に血流を描出可能であり、病変の検出率向上につながっている。本法の欠点は、その診断精度が術者の技量に大きく依存する点にある。術者の育成に加え、学会などによる検査法の標準化が急務といえる。

3. 近赤外線分光法

近赤外線分光法 (near infrared spectroscopy: NIRS) は、酸化ヘモグロビンと還元ヘモグロビンの相対変化を測定することで虚血の有無を判定する検査法である。下肢の任意の部位における虚血判定が可能であること、トレッドミルによる歩行負荷時の虚血判定や、負荷後における虚血からの回復過程を経時的に観察可能なことなどが特徴である。たとえば、前述したABPIは閉塞性動脈硬化症に対して優れた診断感度と特異度とを有する。しかしながら、安静時に下肢の血圧低下を呈さないような軽度狭窄病変例や、石灰化の高度な慢性透析例などでの診断には無効なことがある。NIRSは、歩行負荷などを加えることによって軽症例の診断に有用であり、また、マンシエットを必要としないため、高度石灰化例に対する診断にも有用である。

■ 微小血管造影法の早期発見への応用

新エネルギー産業技術総合開発機構 (NEDO) の支援のもと、浜松ホトニクス (株) を中心に、

NHK エンジニアリングサービス、国立循環器病センター研究所、東海大学医学部などが協力して、病院設置型の微小血管造影装置を開発した。通常の血管造影装置は直径200 μm 程度の血管までしか描出できないが、本造影装置は高出力のX線源と高感度のハイビジョン撮像系との組み合わせにより50 μm 程度の微小血管までの描出を可能としている。

本装置は2004年に国立循環器病センターに移設され、血管新生療法の施行患者を対象にすでに臨床応用されている³⁾。また、糖尿病性微小循環障害の診断に対する臨床応用も始まった。本装置は近い将来、微小血管レベルにおける動脈硬化の新しい画像診断法として用いられる可能性を秘めている。微小血管レベルにおける動脈硬化の進行が、閉塞性動脈硬化症の早期診断においてどのような意味を持つのかは、今後の検討課題である。

おわりに

閉塞性動脈硬化症はquality of lifeへの影響は大きいものの、生命予後に対する影響は小さい。その生命予後は、合併する動脈硬化性疾患によって規定されていると言ってよい。閉塞性動脈硬化症の早期発見によって、動脈硬化の危険因子コントロールを早期に行い、虚血性心疾患や脳血管疾患の予防へと結びつけることが肝要である。

文 献

- 1) Dormandy JA, Rutherford RB: Management of peripheral artery disease (PAD). TASC Working Group. J Vasc Surg 31: S1, 2000
- 2) Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, et al: Therapeutic angiogenesis: a single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. J Clin Invest 93: 662-670, 1994
- 3) 知久正明, ed: 微小血管の描出. メディカ出版, 大阪, 2005. 松尾 汎, ed: Vascular Lab 増刊 血管検査マニュアル

特集
循環器疾患の
画像診断
up to date

モダリティの進歩と話題の検査法

微小血管造影 —新生血管描出への応用—

国立循環器病センター心臓血管内科医長

竹下 聡

Takeshita, Satoshi

日本大学医学部附属板橋病院循環器内科

知久 正明

Chiku, Masuaki

Microangiography-visualization of collateral development-

KEY WORDS

微小血管造影/血管新生

はじめに

従来型の血管造影装置の解像度は200~300 μ mにしかすぎず、これを用いて血管新生療法後の新生血管を描出するのは困難である。なぜなら、血管新生療法により新生する血管は直径100 μ m以下の微小血管が主体であると考えられるからである¹⁾²⁾。放射光を用いた微小血管造影により、直径20~50 μ m前後の微小血管を描出可能であるが、放射光を発生させるには巨大な放射光施設が必要である。たとえば、播磨科学公園都市(兵庫県)にあるSPring 8の周長は1.436mであり、放

射光を用いた微小血管造影装置を病院に設置することは現実問題として不可能なのである³⁾。

そこで、われわれは病院設置型微小血管造影装置を開発した。本稿では、この新しい造影法について概説する。

微小血管造影装置の概要

従来、血管新生療法後の微細な血管網の発達を評価するには、digital subtraction angiography (DSA) が用いられてきたが⁴⁾、その解像度は200 μ m程度とされており、100 μ m以下の微小血管を描出することは困難である。

血管新生療法後の微細な血管網の変

主な略語

DSA :
digital subtraction angiography

CARDIAC PRACTICE
VOL.17 NO.4

CARDIAC PRACTICE 63 (387)

従来の血管造影では直径100 μ m以下の微小血管の描出は困難である。

化を描出するには、微小血管に含まれるわずかな造影剤を検出する必要があり、X線が高輝度で、平行かつ単色であること、また、検出系は高感度・高解像度であることが必須条件となる。血管造影によって描出される血管像とは、血管壁と造影剤との吸収係数の差が写真用フィルム面に投影されたものである。しかし、X線の一部は人体組織に吸収・減衰されるため、検出系前面における単位面積あたりのX線光子量が減少すると撮像像が劣化する。十分にコントラストのある画像を得るには高輝度のX線が必要となる。放射光施設のX線は一般撮影のX線発生装置の100倍以上の高輝度で、一部が被写体に吸収されても検出系には十分なフォトン数を残すことが可能である。しかしながら、このエネルギーをもつX線を作ることは一般施設では不可能である。そこでわれわれは、病院設置型微小血管造影装置のX線源として、大容量・大出力を有するCT用X線管を改変して用いることとした。

血管造影にはヨード含有造影剤が使用されるのが一般的であるが、ヨードは33.3 KeVのエネルギーレベルでK吸収端と呼ばれる質量吸収係数が不連続に上昇する性質がある。X線のエネルギーをヨードのK吸収端の直上のエネルギー付近に単色化すると、ヨードと周囲組織との質量吸収係数の差が最大となるので、コントラストの高い画像を得ることができる。実際には金属

フィルターを用いて疑似単色化することにより、33.3 KeV(ヨードのK吸収端)前後に10 KeVのバンド幅をもつ擬似単色X線を得ることが可能となる。

病院設置型微小血管造影装置の撮像系は高解像度・高感度の蛍光板(浜松ホトニクス製)と、超高感度・高精細撮像管であるアバランシェ型ハイビジョンカメラ(NHK製)により成り立っている。蛍光板の役割は、X線透射像を可視光線に変換しグリーン光を発することにある。われわれが用いた蛍光板は蛍光体のみを堆積して作製してあるため、膜厚が薄く光の拡散が小さいという特徴を有する。これは一般の蛍光板に比べ、高解像度化が可能という利点につながる。また、不純物を含まない高密度と微細な柱状結晶構造は減光を大幅に削減し、高感度を保つことが可能となる^{5) 6)}。撮像管の光伝導膜はアバランシェ効果により信号増倍を定常状態の600倍まで増倍可能であり、さらに、増倍に伴う雑音が付加されないという特徴も有している。

テストチャートを用いた解像度の検討では、既存の血管造影装置が250 μ mであったのに対し、微小血管造影装置では50 μ mと高解像度が実現できた。イヌの冠微小血管の描出に関する実験では、既存の血管造影装置を用いると血管端が不明瞭で、分岐に伴う血管径の減少を確認できなかったが、微小血管造影装置を用いると、心筋貫通枝の血管径が分岐のたびに減じていく様子

が詳細に観察可能であった。ウサギの下肢虚血モデルを用いた実験では、既存の血管造影装置では小血管の描出が不良であったのに対し、微小血管造影装置ではアデノシン投与後に100 μ m以下の微小血管が拡張する様子が鮮明に観察可能であった(図1)。

微小血管造影装置の安全性に関しては、管電圧70kV、管電流500mAで20秒照射した場合、吸収線量は0.547Sv(62.7R)、散乱X線量は0.0225mSv(2.58mR)であり、通常の造影装置と同等の被曝安全性が期待された。

微小血管造影装置の臨床応用

当施設における微小血管造影装置の臨床応用は、血管新生療法の施行症例に限定しており、これまでに計4名に対し合計8回の微小血管造影を施行した。

微小血管造影装置により、100 μ m以下の微小血管を鮮明に描出することが可能となり、通常のDSAと比較すると、少なくとも1~2分枝以上の末梢側血管が描出可能であった(図2)。

1ヵ月~1年の間隔において施行したフォローアップ造影における微小血管の再現性は良好であった。なお、1回の検査における吸収線量は24mGryと臨床上問題のない線量であった。

以上のように、微小血管造影装置は従来の血管造影と同等の安全性を有し

■ 病院設置型微小血管造影装置は直径50 μ mの微小血管の描出が可能である。

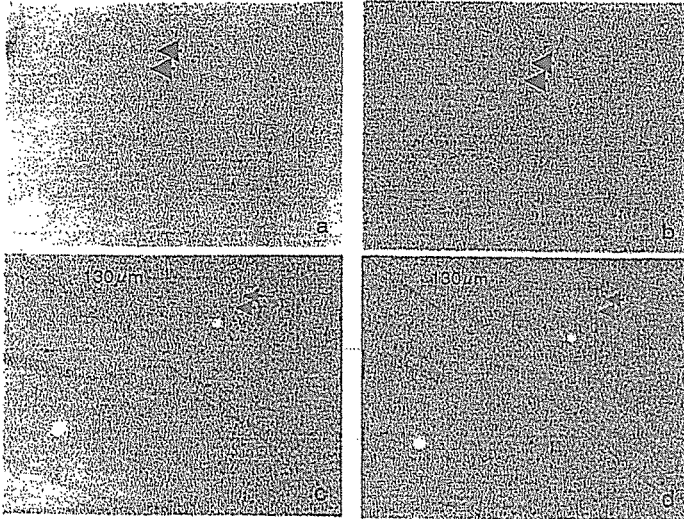


図1 従来の血管造影法と微小血管造影法による家兎の下肢側副血行路の比較

従来法では、アデノシン投与前(a)と投与後(b)のいずれでも側副路の描出は不可能である。しかし、微小血管造影法では側副路が明瞭に描出され、アデノシン投与後(d)では投与前(c)に比べ著明な拡張が認められる。

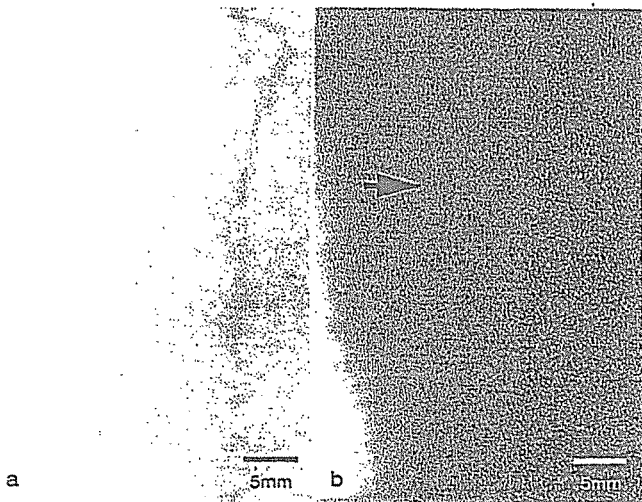


図2 バージャー病症例での微小血管造影

従来法によるDSAでは下肢血管はほとんど描出されないが(a)、微小血管造影法を用いると、そのような領域にも血管が存在することが確認可能である(b)。

ており、その血管描出能は通常装置に比し優れていることは明白である。造影検査を繰り返して施行し得た症例における微小血管の再現性も良好で、血管新生療法前後における新生血管の評価に関しても、本装置を用いることにより、既存の装置では得られない微小血管レベルでの評価が可能と思われる。

おわりに

病院設置型微小血管造影装置を用いることにより50 μ m前後の微小血管が観察可能であり、その安全性や再現性についても臨床問題にはなかった。末梢動脈閉塞症に対する血管新生療法により、微小側副血管がどのように発達促進するのか、その解明には今後の症例の積み重ねが必要である。

●文 献

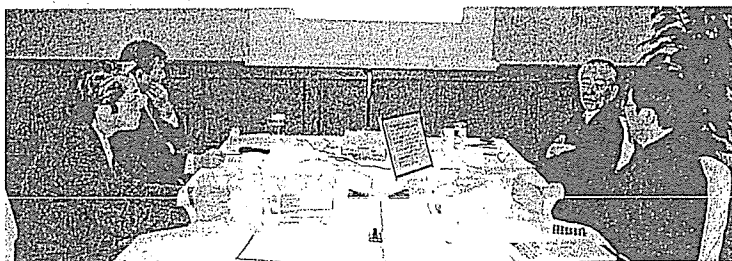
- 1) Mori H, Hyodo K, Tobita K, et al : Visualization of penetrating transmural arteries *in situ* by monochromatic synchrotron radiation. *Circulation* 89 : 863-871, 1994
- 2) Takeshita S, Isshiki T, Mori H, et al : Use of synchrotron radiation microangiography to assess development of small collateral arteries in a rat model of hindlimb ischemia. *Circulation* 95 : 805-808, 1997
- 3) Takeshita S, Isshiki T, Ochiai M, et al : Endothelium-dependent relaxation of collateral microvessels



- after intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rat model of hindlimb ischemia. *Circulation* 98 : 1261-1263, 1998
- 4) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al. Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation (TACT) Study Investigators : Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells ; a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 360 : 427-435, 2002
- 5) Tanioka K : A highly sensitive camera tube using avalanche multiplication in an amorphous selenium photoconductive target. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng* 1656 : 1-12, 1992
- 6) Kubota M, Kato T, Suzuki S, et al : Ultrahigh-sensitivity new super HARP camera. *IEEE Trans Broadcasting* 42 : 251-258, 1996
- 7) Umetani K, Ueki H, Takeda T, et al : High-spatial-resolution and real-time medical imaging using a high-sensitivity HARPICON camera. *J Synchrotron Radiat* 5 : 1130-1132, 1998
- 8) Tanioka K, et al : Ultra-high-sensitivity New Super-HARP Pickup Tube. *IEEE Workshop on CCD and Advanced Image Sensors*. 2001

座 談 会

ナノメディシン・プロジェクト —厚生労働省指定型ナノメディシン・ プロジェクトを中心に—



【写真左より馬場嘉信先生、盛 英三先生、菅 弘之先生、杉町 勝先生】

出席者（発言順）

菅 弘之	国立循環器病センター研究所/司会
盛 英三	国立循環器病センター研究所心臓生理部
馬場 嘉信	名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻応用化学分野
杉町 勝	国立循環器病センター研究所先進医工学センター循環動態機能部

■ はじめに；厚生労働省指定型ナノメ ディシン・プロジェクトの概要説明

菅 本日は「ナノメディシン (nanomedicine)・プロジェクト」というテーマで厚生労働省指定型ナノメディシン・プロジェクトを中心に、このプロジェクトに深くかかわっていらっしゃる先生方にお集まりいただき、お話を伺いたいと思います。

まずはじめに、「ナノメディシン・プロジェクト」の概要について説明いたします。ナノメディシン・プロジェクトは、2002年（平成14）年から5年間の予定で、厚生労働科学研究萌芽的先端医療技術推進研究として開始されました。指定型研究と公募型研究からなり、指定型研

究では、国立高度専門医療センター（循環器病、がん、精神神経、成育医療、国際医療）、国立医薬品食品衛生研究所、財団法人医療機器センターなどの厚生労働省関係機関や大学、民間企業などの研究者が積極的に産学官連携をし、研究をおこなっています。そして、そのプロジェクトリーダーを私が務めさせていただいております。

プロジェクトは、本日ご参加いただいている盛英三先生が中心となっておこなっている超微細画像（ナノイメージング）、杉町勝先生が中心となっておこなっている微小医療機器・操作技術開発（ナノデバイス）、そして国立国際医療センターの山本健二先生が中心となっておこなっている薬物搬送システム（drug delivery system：DDS）、馬場嘉信先生が研究協力者としてご参加されて



国立循環器病センター研究所長/
厚生労働省指定型ナノメディ
シン・プロジェクトリーダー

すが・ひろゆき
1941年、岡山県生まれ。
1960年、岡山朝日高等学校卒業。
1966年、岡山大学医学部医学科
卒業、医学士。
1970年、東京大学大学院医学系
研究科博士課程修了、医学博士。
東京医科歯科大学医用
器材研究所生体計測講座助手。
1971～1973年、米国留学 Johns
Hopkins 大学医学部生体工学教
室 Postdoctoral Fellow。
1975～1978年、米国留学 Johns
Hopkins 大学医学部生体工学教
室 Assistant Professor。



1978～1982年、国立循環器病センター研究所心臓生理部長。
1982～1991年、同研究所循環動態機能部長。
1991～2000年、岡山大学医学部生理学第二講座教授。
2000年より現職。
専門：循環生理学、とくに心臓生理学および医用工学。なお、ナノメディ
シン関連では、拍動心臓内のクロスブリッジ動態のX線回折研究。
研究テーマ：心臓力学および心臓エネルギー学の統合的分析。
趣味：旅行、ドライブ、電気電子工作。
好きな言葉：初志貫徹、余人をもって代え難し、など。
E-mail : hsuga@ri.ncvc.go.jp
E-mail & PVA Club HP : <http://www.eonet.ne.jp/~emaxpva/>

おり、医療機器センターの長谷川誓重先生が中心となっ
ておこなっている基盤データベース研究・技術評価の4
本の柱からなっています。スタート時より府省連携、省
庁横断、医工連携、産学官連携などの方針に沿って進め
ております。

プロジェクトは現在5年目です。2006年度いっばい
で、この指定型研究はひとまず終わりを告げますが、2006
年度から第3期科学技術基本計画にも沿ってプロジェク

トを進めております。

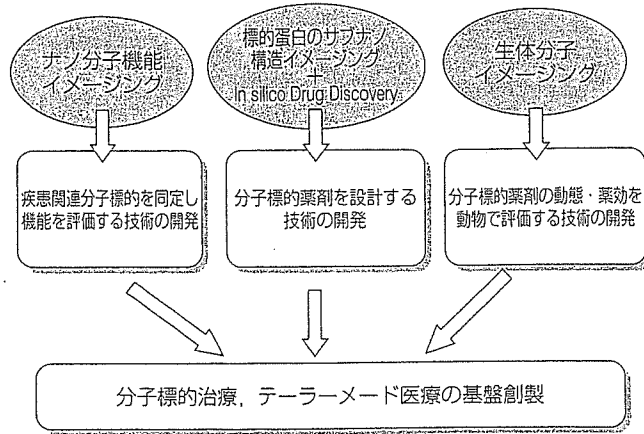
■ ナノイメージングの目的、進捗状況、 具体的成果

1) 分子標的治療の基盤としてのナノレベルイメー ジング

菅 先生では、まず、盛先生から「ナノレベルイメー
ジングによる分子の機能および構造解析」についてご説
明ください。

盛 先生われわれの研究テーマは「ナノレベルイメー
ジング」というものです。ナノレベルイメージングをいい
かえますと「蛋白分子の超微細画像技術」となります。
この蛋白分子の超微細画像技術、これは機能と構造の両
面をもっておりますが、これを中核として、将来求めら
れている分子標的医療の基盤技術を創製しようというも
のです。このなかに含まれるものは、蛋白分子の構造イ
メージング、蛋白分子の機能イメージング、そして、大
動物を用いた分子イメージングが包含されています。

図④に示すように、個別にみていきますと、1番左のナ
ノ分子機能イメージングでは、分子の機能を可視化する
ことによって疾患関連分子を治療の標的として同定す
ることを目的とします。そして、標的蛋白のサブナノ構造
イメージングと、*in silico* のドラッグディスカバリーを
組み合わせますと、分子標的薬剤を設計する基盤技術が
できます。このようにしてつくられてきた分子標的薬剤



図④ 分子標的治療、テーラーメイド医療の基盤創製
(盛英三先生よりご供与)