

及し、わが国でも1990年代半ばより行われるようになった。現在大動脈弁疾患(AS/AR)に対するRoss手術は国内外において一定の評価を得ている^{3)~7)}。特に小児例においては成長の問題があり、成人における必要最小限の人工弁サイズ(男性21mm, 女性19mm)を挿入できない場合が多い。そのため小口径人工弁を使用する場合は遠隔期の再手術が不可避である。小児期Ross手術後では移植した肺動脈弁の成長が得られることから⁸⁾、当院では大動脈弁置換が必要な幼小児期症例においては第1選択と考えている。一方、まだ手術侵襲の高さゆえのtherapy-related mortalityが比較的高く、施設間でのレベルの差が厳然と存在することも事実である。

近年、10年以上経過する症例が蓄積されるに従い、autograftの閉鎖不全の進行、再建した肺動脈弁の狭窄の進行からRoss手術の再手術例が増加してきており、適応について慎重であるべきとの見解も増加してきている⁹⁾¹⁰⁾。Ross手術は大動脈弁、肺動脈弁の2弁置換であり、10~20年先の長期予後についてはまだ不明な点が多く、今後も慎重な経過観察が必要であり、適応にあたっては患者への十分な説明が必要である。

広義のRoss手術には大動脈基部置換術単独を意味するRoss手術と左室流出路切開を加えるRoss-Konnoを含むことが多いが、当院のRoss-Konno手術施行例は平均介入年齢が8歳8カ月と比較的低年齢・低体重であり、半数以上の症例で新生児期もしくは乳児期早期に大動脈弓奇形の手術を施行されている。このことから機械弁置換に替わる治療としてのRoss手術群にRoss-Konno群を加えることは妥当ではないと判断し今回のスタディの対象からは除外した。

今回のわれわれの検討ではMV群では経年的に上行大動脈の流速・圧較差は増大する一方、術後5年においては有意なASRを認めていない。運動耐容の面においても中期遠隔期では有意差を認めていない。諸外国の報告においてもRoss群はMV群もしくは正常コントロール群と比較し遜色ない心肺機能を有するとされている^{11)~13)}。

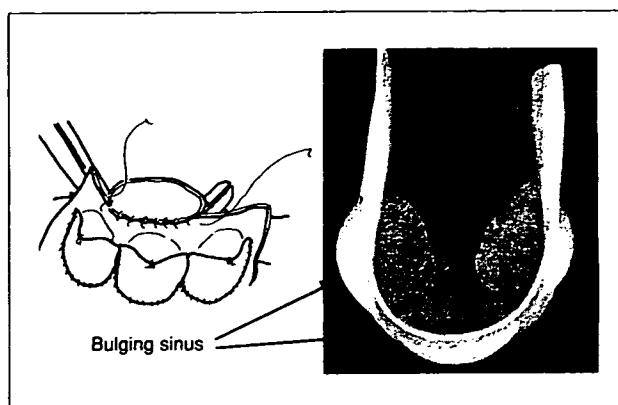



図5 山岸式3弁付PTFEグラフト

3弁付きPTFEグラフトの状態についてはおおむね良好であるが、術後7年経過した1例で左室・右室が等圧となる高度の狭窄を認め、バルーン弁形成術を行ったが無効であったため、後日導管置換を施行した。本症例では石灰化によりバルーンの破損を認めた。PTFEグラフトの流速が2m/sを超える症例も術後3年の時点で4例存在し、潜在的な導管置換のcandidateであると考えられる。比較的低体重で施行した症例については成長に伴うRastelli術後の導管置換が一般的に行われるのと同様、術後遠隔期の導管置換を念頭において経過観察および患者への説明をする必要があると考えられた。

現在われわれのRoss手術はautograftによる大動脈弁置換と手作りの3弁付きPTFEグラフト(山岸弁)による右室流出路再建を施行している(図5)²⁾。現在の術後症例の蓄積はまだ数年であるが、弁機能についても良好な印象を得ている。

術後の内科管理としてMV群は全例ワルファリンを含めた投薬を受けているが、Ross群は1例を除き無投薬であり、当然ながら抗凝固療法は行われていない。抗心不全薬についてはMV群での投薬が優位に多かったが、これは基本的にMV群ではワルファリンの定期投薬が必要なために、追加で抗心不全薬の投薬を継続しているというバイアスの可能性もある。

大動脈弁疾患に対する治療戦略において、ASに対してはバルーンによる大動脈弁形成術(ballon



valvoplasty to AS; BVP-AS)も小児期においては多大な役割を果たし、根治には至らずとも手術至適体重・年齢まで待機するためのいわゆる時間稼ぎとして有効である。今回Ross手術となった症例のうち3例においてBVP-ASが先行していた(図3)。現在Ross手術もしくは機械弁置換の適応が考慮されているASの外來患者群においてもBVP-ASのみでいわゆる時間稼ぎができていた症例が多数存在し、本治療の姑息術としての有効性も再認識された。

最後に本研究は後方視的なhistorical controlによる検討であり、Ross群、MV群でのランダム化による比較検討には至っていないという限界の認識が必要である。

○ 結語

運動が活発で酸素摂取量が多く求められる小児期から青年期にかけて、Ross手術は機械弁置換に比較して血行動態上劣らず、抗凝固療法が不要である点で都合のよい術式といえる。現在活動性のそれほど高くない成人男性においては積極的にRoss手術を選択しなければいけないという根拠をわれわれは持たないが、成長という問題のある乳幼児から思春期の症例および妊娠出産の可能性のある若年女性に対しては今後も適応が考慮されるべき術式であると考えられる。今後も症例の蓄積および両半月弁機能を中心とした長期的観察が望まれる。

文 献

- 1) Ross DN : Replacement of aortic and mitral valves with pulmonary autograft. *Lancet* 1967 ; 2 : 956-958
- 2) Yamagishi M, Emmoto T, Wada Y, et al : Pulmonary

reconstruction in the ross procedure : combined autologous aortic and polytetrafluoroethylene valve. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998 ; 116 : 1076-1077

- 3) Chambers JC, Somerville J, Stone S, et al : Pulmonary autograft procedure for aortic valve disease : long term results of the pioneer series. *Circulation* 1997 ; 96 : 2206-2214
- 4) Brown JW, Stevens LS, Holly S, et al : Surgical spectrum of aortic stenosis in children : a thirty-year experience with 257 children. *Ann Thorac Surg* 1988 ; 45 : 393-403
- 5) Brown JW, Ruzmetov M, Vijay P, et al : Surgery for aortic stenosis in children : a 40-year experience. *Ann Thorac Surg* 2003 ; 76 : 1398-1411
- 6) Karamlou T, Jang K, Williams WG, et al : Outcomes associated risk factors for aortic valve replacement in 160 children. A completing-risks analysis. *Circulation* 2005 ; 112 : 3462-3469
- 7) Hrqaska V, Krajci M, Haun C, et al : Ross and Ross-Konno procedure in children and adolescents : mid-term results. *Eur J Card Thorac Surg* 2004 ; 25 : 742-747
- 8) Elkins RC, Knott-Craig CJ, Randolphn JD, et al : Medium term follow-up of pulmonary autograft replacement of aortic valves in children. *Eur J Cardiothorac Surg* 1994 ; 8 : 379-383
- 9) Jonas RA : The Ross procedure is not the procedure of choice for the teenager requiring aortic valve replacement. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu* 2005 ; 176-180
- 10) Pasquali SK, Cohen MS, Shera D, et al : The relationship between neo-aortic root dilatation insufficiency, and reintervention following the Ross procedure in infants, children, and young adults. *J Am Coll Cardiol* 2007 ; 49 : 1806-1812
- 11) Laforest I, Dumesnil JG, Briand M, et al : Hemodynamic performance at rest and during exercise after aortic valve replacement : comparison of pulmonary autografts versus aortic homografts. *Circulation* 2002 ; 106(suppl I) : I57-I62
- 12) Oury JH, Doty DB, Oswalt JD, et al : Cardiopulmonary response to maximal exercise in young athletes following Ross Procedure. *Ann Thorac Surg* 1998 ; 66 : S153-154
- 13) Pibarot P, Dumensnil JG, Briand M, et al : Hemodynamic performance during maximum exercise in adult patients with Ross operation and comparison with normal controls and patients with aortic bioprostheses. *Am J Cardiol* 2000 ; 86 : 982-988

成田論文に対するEditorial Comment

饗庭 了

慶應義塾大学外科(心臓血管外科)

成田論文は、Ross手術がその施設や外科医の水準を示す指標としての手術であることで一種のブームとなった1990年代から中期遠隔期成績が出てきたという意味で時期を得た発表といえる。

2007年現在、その適応には大きく2種類存在する。

1つは乳幼児期の大動脈弁疾患の多数をしめる大動脈弁狭窄症において、弁交連切開が困難または不成功な場合である。人工弁置換は最小のサイズでも挿入不能ないしKonno法などの弁輪拡大術(遠隔期の左室機能障害をもたらすことが知られている)が必要なので、事実上Ross手術が唯一とすべき大動脈弁置換術式である。しかし、弁交連切開が技術的に可能であっても有意な弁レベルでの圧較差が残存することが予想される場合、どの程度を許容するか(大動脈弁交連切開術かRoss手術のいずれを採用するか)では施設間の方針に大きな隔りがある。肺動脈弁autograftが唯一の成長可能な大動脈弁代用弁であることはこの年齢層の患者にとって大きな魅力であるが、一方、本術式が2弁置換術であることで、autograft肺動脈弁や肺動脈壁の組織特性による閉鎖不全の発生や肺動脈弁位に移植される弁の遠隔期合併症と再手術の頻度の高さの報告が相次いだことから、再びその適応については慎重な意見が増えてきている。

またもう一つのRoss手術の適応は、若年者(特に妊娠出産の可能性のある女性)や大動脈弁およびその周囲の感染などによる大動脈弁狭窄

または閉鎖不全で、人工弁という選択肢が存在する場合である。この場合にはRoss手術は患者の生活様式を考慮した選択術式の一つとして位置づけられる。Ross手術は人工弁を用いた古典的な大動脈弁置換手術に比較すると、手術手技上煩雑かつ複雑であり人工心肺運転時間や心筋虚血時間などに代表される手術時間が長くなるのは必然であるので、この点が手術早期成績に悪影響を及ぼさない技術的水準が外科チームにまず求められる。

一方でRoss手術耐術患者の生活の質は人工弁のそれに比較して格段に良好である。それは単に抗凝固療法が不要で血栓症や出血のリスクがないというのみならず、弁機能そのものが優秀であることに起因している。成田論文のなかにおいても、上行大動脈内血流速度が肺動脈弁autograftで機械弁よりも術後早期から中期遠隔期まで一貫して低値に抑制されていた所見が認められた。これは安静時の測定であり運動時の差はさらに拡大する可能性が高い。Ross手術を受ける患者の大部分は小児か若年者であり、その活動性の高さや余命の長さを考慮した場合、肺動脈弁autograftの弁機能の優秀性はRoss手術の適応決定に大いに考慮されるべき要素である。

以上のようにRoss手術の適応決定において、多くのtrade-offの関係にある要素のうち、成田論文は中期遠隔期の弁機能に関する知見を追加した点で価値あるものと判断する。

A case report of surgical correction for congenital mitral regurgitation with subvalvular apparatus abnormality

Mikihiko Kudo, MD · Ryohei Yozu, MD
Ryo Aeba, MD · Kiyokazu Kokaji, MD
Naritaka Kimura, MD · Shiro Iwanaga, MD

Received: 28 August, 2007 / Accepted: 4 October, 2007
© The Japanese Association for Thoracic Surgery 2008

Abstract We report a successful complex mitral valve plasty using port access minimally invasive cardiac surgery for congenital mitral regurgitation that presented as an abnormality of the subvalvular apparatus. A 16-year-old male patient received a diagnosis of mitral regurgitation resulting from tethering of the anterior mitral leaflet and posterior mitral leaflet caused by an abnormality in papillary muscle insertion and a hypoplastic chordae tendineae. The posterior leaflet was closely tethered to the tips of the papillary muscle with essentially no chordae tendineae. The flexibility of the leaflet was restored by surgically removing the abnormal chordae, and reconstruction of chordae tendinae of the anterior leaflet was carried out using three loops and of the posterior leaflet using one loop with a loop technique method. As an additional procedure for persistent regurgitation, an edge-to-edge technique to the posterior commissure side was performed, after which the mitral regurgitation disappeared.

Key words Loop technique · Mitral valve plasty · Subvalvular apparatus abnormality · Port access minimally invasive cardiac surgery · MICS

Introduction

Various surgical techniques have been reported for mitral valve plasty (MVP), all of which show good results.^{1,2} MVP is enabled by adjusting various techniques in the case of a complicated lesion. We report a successful complex MVP using port access minimally invasive cardiac surgery (MICS)³ for congenital mitral regurgitation that presented as an abnormality of the subvalvular apparatus.

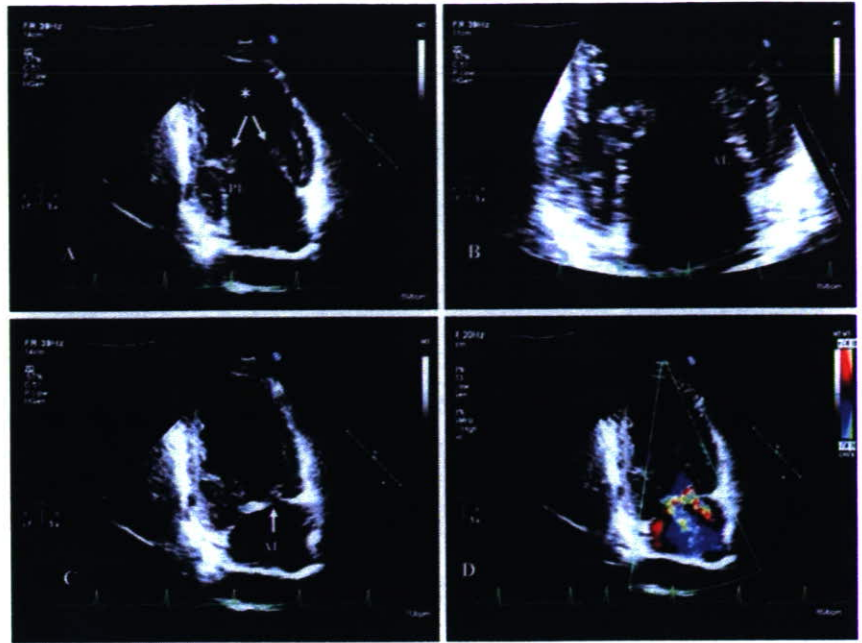
Case report

A 16-year-old male patient who had been followed for 4 years at another hospital under a diagnosis of mitral regurgitation (MR) was referred to our hospital for a detailed examination because he became aware of breathlessness during exercise. On admission, his height was 159 cm, body weight was 57 kg, and blood pressure was 116/70 mmHg. On physical examination, a high-pitched systolic regurgitant murmur (Levine III/VI) at the lower left sternal border and a low-pitched early-diastolic rumble at the apex were detected. Electrocardiography showed left ventricular hypertrophy with normal sinus rhythm. Echocardiography revealed moderate MR resulting from tethering of the anterior mitral leaflet (AML) and posterior mitral leaflet (PML) caused by an abnormality in papillary muscle insertion and a shortening of the chordae tendineae. Notably, the PML was closely tethered to the tips of the papillary muscle with essentially no chordae tendineae (Fig. 1). Progression of MR was accepted in comparison with an echo provided by another hospital. LV end-diastolic and end-systolic dimensions (LVEDD/LVESD) were 58/38 mm, and the

M. Kudo (✉) · R. Yozu · R. Aeba · K. Kokaji · N. Kimura
Department of Surgery, School of Medicine, Keio University,
35 Shinano-machi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan
Tel. +81-3-3353-1216; Fax +81-3-5379-3034
e-mail: m-kudo@sc.itc.keio.ac.jp

S. Iwanaga
Department of Cardiology, Keio University, Tokyo, Japan

Fig. 1 Preoperative echocardiography. **A,B** Abnormality in papillary muscle insertion (*). The posterior leaflet was severely tethered to the tips of the papillary muscle with essentially no chordae tendineae. **C** A central part of the anterior leaflet was tethered by secondary chorda tendineae (arrows). **D** Doppler color flow image shows the regurgitation jet from the two junctions of the mitral valve. **A,B** Diastolic phase; **C,D** systolic phase. *PL*, posterior mitral leaflet; *AL*, anterior mitral leaflet



LV ejection fraction was 59%. The posteromedial papillary muscle insertion site and inferoposterior LV wall showed severe hypokinesis. Under cardiac catheterization, a pressure study showed that LV end-diastolic pressure was 13 mmHg and pulmonary artery wedge pressure was 12 mmHg. Furthermore, LVEDV showed 178.7 ml, showing potential for the enlargement of left ventricle volume.

Operative technique

Cardiac exposure was obtained by right anterior small thoracotomy by means of port access MICS. The mitral valve and subvalvular apparatus were observed via right-sided left atriotomy. The flexibility of the AML was maintained and the leaflet was approximately normal; however, two secondary chorda tendinae were fixed to a portion of the central part of the AML. The PML presented a fixation such that it was drawn into the free wall of the left ventricle. The secondary chorda tendinae of the AML was removed, and the flexibility of the PML was restored by surgically removing the three short chordae tendinae that had been attached to it. Next, replacement of these chordae tendinae was performed using the loop technique (5-0 Gore-Tex polytetrafluoroethylene sutures).⁴ After having fixed the neochordae with two loops to each papillary muscle, reconstruction of the AML was carried out using three loops and of the PML using one loop (Fig. 2). A coaptation line and movement of the bileaflet valve proved satisfactory in

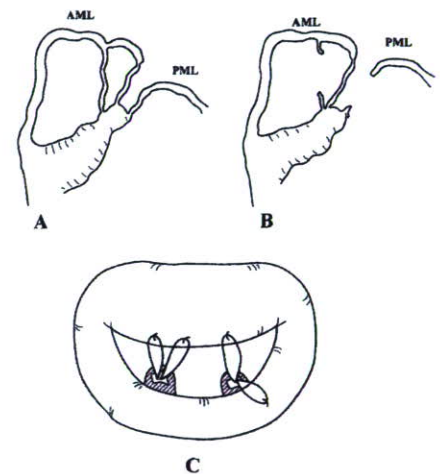
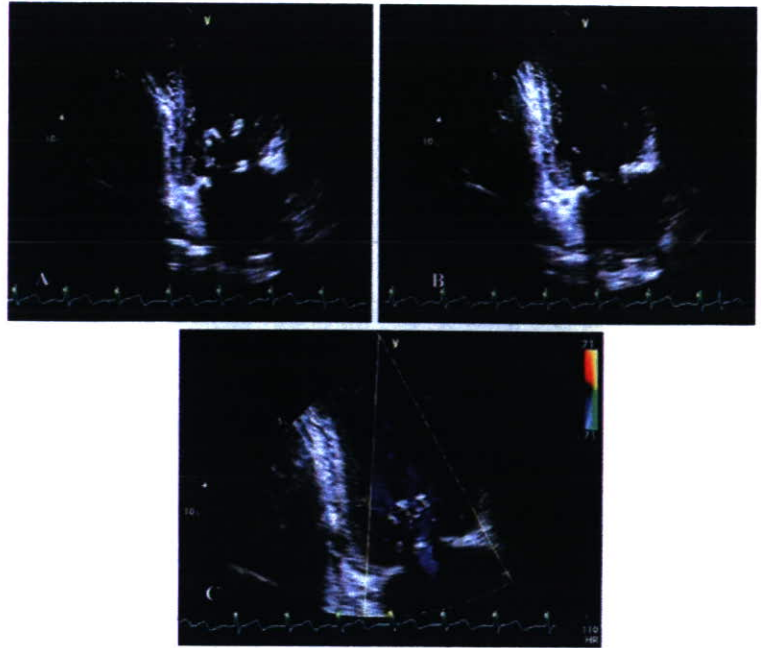


Fig. 2 Schematic presentation of the surgical procedure. Secondary chordae of the anterior leaflet and abnormal shortening of chordae of the posterior leaflet were divided to allow the flexibility of the leaflet (**A,B**). Reconstruction using a loop technique of the AML was carried out using three loops and of the PML using one loop. *AML*, anterior mitral leaflet; *PML*, posterior mitral leaflet

this plasty; however, a small degree of MR remained on the posterior commissure side. As an additional procedure for persistent MR, an edge-to-edge technique to the posterior commissure side was performed, after which the MR disappeared. Ring annuloplasty was carried out using a 32-mm Cosgrove annuloplasty ring. After this procedure, transesophageal echocardiography revealed a dramatic reduction of MR; however, extremely mild mitral stenosis remained (Fig. 3). The postoperative course was uneventful.

Fig. 3 Postoperative echocardiography showed physiological movement of both leaflets and no residual mitral regurgitation



Discussion

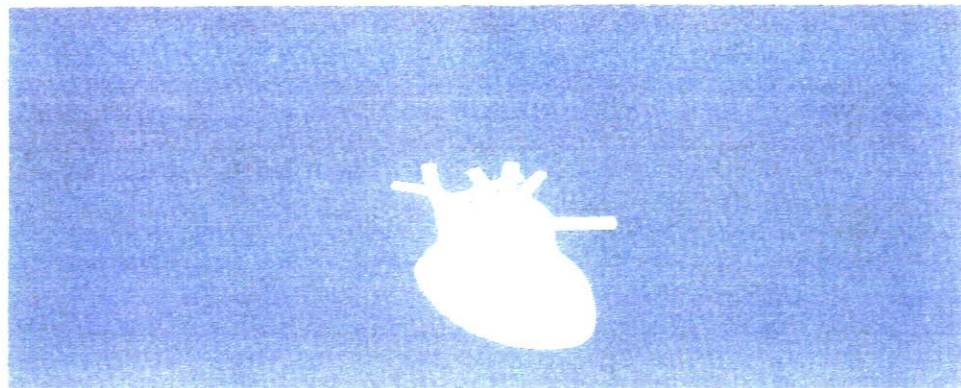
In this case, because the MR had resulted from abnormal papillary muscle insertion and marked foreshortening of the chordae tendineae, use of the standard MVP procedure was difficult. For valvuloplasty in younger patients, the ideal approach is to perform valve plasty while securing as wide a mitral valvular area as possible to allow for future physical growth. A valvular excision and resuture can cause partial degradation of leaflet mobility as a result of consolidation and cicatrization.⁵ In this patient, therefore, the loop technique was employed in an attempt to preserve the mobility of the posterior mitral leaflet, to allow a broad range of plasty and to maintain as large a mitral valve area as possible.⁶ The aberrant short chordae causing tethering were therefore surgically removed to permit recovery of the flexible leaflet. Because multiple neochordae tendineae were necessary in this case, artificial chorda replacement was employed using the loop technique. Using this method, a satisfactory coaptation line was successfully formed by reconstruction with neochordae, and a loop technique method that permitted multiple and simultaneous replacement proved effective.⁴ A second congenital anomaly resulted in a papillary muscle being present in the vicinity of a mitral valve. It appeared likely that physiological movement of the leaflet would be inhibited by this papillary muscle because it was in close proximity to the leaflet edge. As a solution, the distance between the papillary muscle and the valve leaflet was increased by fixing the neochorda unit to the central portion of the

papillary muscle. Preservation of physiological leaflet motion was thus enabled.

Valve replacement can now be performed safely with relatively low morbidity and mortality. However, the MVP is preferable in young patients because it reduces the need for long-term anticoagulation treatment and provides a more physiological correction of the lesion. MVP in MR caused by congenital anomaly appears to be feasible by adopting various techniques, as was demonstrated in this case. In addition, initial operations using port access MICS will enable safe reoperation using standard procedures in the future.

References

1. David TE, Ivanov J, Amstrongs S, Christie D, Rakowski H. A comparison of outcomes of mitral valve repair for degenerative disease with posterior, anterior and bileaflet prolapse. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;130(5):1242–9.
2. David TE, Armstrong S, Sun Z. Replacement of chordae tendineae with Gore-Tex suture: a ten-year experience. *J Heart Valve Dis* 1996;5:352–5.
3. Yozu R, Shin H, Maehara T. Minimally invasive cardiac surgery by the port-access method. *Artif Organs* 2002;26:430–7.
4. Oppell UOV, Mohr FW. Chordal replacement for both minimally invasive and conventional mitral valve surgery using pre-measured Gore-Tex loops. *Ann Thorac Surg* 2000;70:2166–8.
5. Kudo M, Yozu R, Kokaji K, Iwanaga S. Feasibility of mitral valve repair using the loop technique. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2007;13:21–6.
6. Kudo M, Yozu R, Kokaji K, Anzai T, Iwanaga S. Mitral valve plasty using “loop technique” method. *Heart* 2006;38(5):459–65.



心臓血管外科 テキスト

編著

龍野勝彦 *Katsuhiko Tatsuno* 【榊原記念病院特命顧問】

重松 宏 *Hiroshi Shigematsu* 【東京医科大学教授】

幕内晴朗 *Haruo Makuuchi* 【聖マリアンナ医科大学教授】

四津良平 *Ryohai Yozu* 【慶應義塾大学教授】

安達秀雄 *Hideo Adachi* 【自治医科大学教授】

中外医学社

11 左冠動脈肺動脈起始

左冠動脈肺動脈起始 anomalous origin of the left coronary artery from the pulmonary artery (ALCAPA) は別名 Bland-White-Garland 症候群ともよばれ、まれな先天性心疾患で、通常は単独疾患である。

小児期に心筋虚血さらには心筋梗塞を引き起こす原因疾患として代表的なものであり、自然予後はきわめて不良で、生後 1 年時の生存率は 10% 未満である。

1. 病態生理

胎児期には肺動脈から動脈管を介して下半身への血流が担われるために、肺動脈から起始している左冠動脈には順行性に血流が維持されるので心筋虚血になることはない。新生児期には肺血管抵抗が高いうちは順行性に血流が維持されるが、これが乳児期にかけて正常値に近づいて低下するにつれて順行性血流量も低下し、心筋虚血を引き起こすことがしばしばある。この時期に左右冠動脈間の側副血行路が十分に形成されなければ、重篤な心筋虚血さらには心筋梗塞を引き起こして左室心筋機能不全、僧帽弁乳頭筋不全による閉鎖不全を続発し、左室は拡大する。側副血行路の形成がみられれば左冠動脈の血流は側副血行路を介して逆行性となり、これらの流量は左室の容量負荷となる。学童成人期へと移行できても、肺動脈への coronary steal 症候群による心筋虚血を引き起こすことがしばしばある。右冠動脈は血流が多いので拡大蛇行する (図 3-51)。左冠動脈開口部の狭窄がみられる症例では、成人期でも自覚的症状がない場合があるが、それでも突然死のリスクが非常に高いとされている。以上の理由により、この疾患はどの時期に診断がついた場合でもその時点で手術適応とされる。

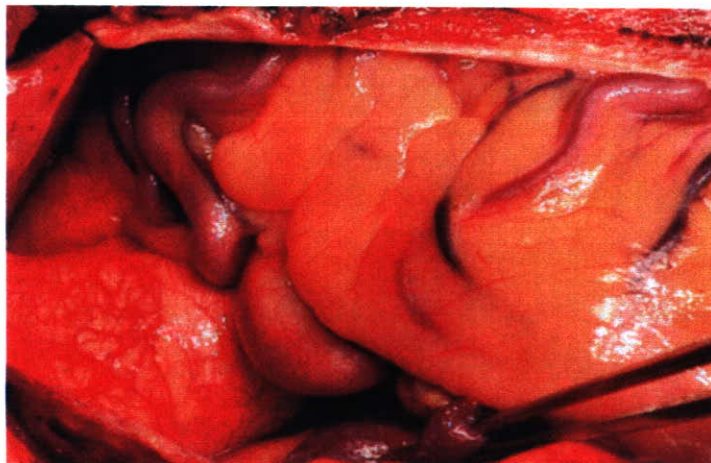


図 3-51 学童期の ALCAPA の術中写真
右冠動脈の著明な拡大蛇行が認められる。

2. 手術

左冠動脈再建術式としては多く発表された²⁾経緯があるが、直接再植え込み法 direct reimplantation と肺動脈内トンネル法 (Takeuchi 法) の2つが代表的な術式である。

1) 直接再植え込み法 (図 3-52)

完全大血管転位の arterial switch と同様の手技を用いて、肺動脈の左 Valsalva 洞の壁をくりぬくことにより冠動脈ボタンを作成して、上行大動脈壁の左後方に作成した新冠動脈口と吻合する。この際、主肺動脈は左右分岐部のレベルでいったん切断し、冠動脈の移植後に自己心膜またはゴアテックスのパッチを用いて冠動脈ボタンの欠損部を補填した後、再縫合する。

2) 肺動脈内トンネル法

主肺動脈前壁のコの字型フラップと大動脈肺動脈間の“window”を作成し、フラップが冠動脈口を覆うように肺動脈内の後壁に縫合し、トンネルによって左冠動脈の血流再建を行う。フラップの欠損部は自己心膜などで補填する。

術式の使い分けとしては、動脈 switch 手術や Ross 手術の経験が蓄積された現在では直接再植え込み法が最も多く採用されている。一般的には左冠動脈口の位置が左 Valsalva 洞の右寄りまたは中央にある場合には、直接再植え込み法により吻合部に緊張がかからない再建が可能である。左冠動脈口の位置が左寄りにある場合には、1) 肺動脈内トンネル法、2) 動脈 switch 手術で使用する trap-door 法を応用した直接再植え込み法の変法、3) 大動脈前壁と肺動脈後壁とを用いて作成した自己血管壁導管を応用した直接再植え込み法の変法、などが外科医や施設の経験によって採用されている。左冠動脈の開口部の位置の同定は最終的に肺動脈を切開し直接視認することにより行うので、この段階までの主肺動脈の切開はどちらの術式にでも conversion できる程度に留めておくことが肝要である。どの冠動脈再建術式を採用するにしても、この手術では術中の心筋保護に特別の配慮を要する。左室の容量負荷を軽減するために人工心肺確立後速やかに vent を挿入する。通常通り上行大動脈の遮断と同時に順行性に心筋保護液を注入する際に、主肺動脈また



図 3-52 直接再植え込み法 direct reimplantation の施行例

主肺動脈を切断して、左冠動脈のボタンを Valsalva 洞全体からくりぬいたところである。

は左右分岐肺動脈をも同時に遮断する。特に学童成人期の手術では、側副血行路が左右冠動脈間のものばかりでなく気管支動脈系のものも発達していて、心筋保護液の注入による心停止の効果が短いので、主肺動脈を切開した後に左冠動脈口より選択的な注入を追加する。中等度ないし超低体温を用いて、人工心肺の灌流量を下げたり循環停止にすることが必要になる場合がしばしばある。

また新生児乳児期では非可逆的な心筋傷害を合併している例が少なくない。合併する僧帽弁閉鎖不全に対する外科的処置を要することもある。これらに対して人工弁置換の成績は不良であり、部分的弁輪縫縮や Alfieri stitch を考慮する。また左室自由壁の重度機能不全に対しては、自由壁切除による左室容量軽減術が有効な可能性がある。

★文 献

- 1) Dogde-Khatami A, et al. Anomalous origin of the left coronary artery from the pulmonary artery: Collective review of surgical therapy. *Ann Thorac Surg.* 2002; 74: 946-55.
- 2) Takeuchi S, et al. New surgical method for repair of anomalous left coronary artery from pulmonary artery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1979; 78: 7-11.

〈饗庭 了〉

心臓血管外科テキスト ©

発行 2007年9月1日 初版1刷

編著者 龍野勝彦
重松宏
幕内晴朗
四津良平
安達秀雄

発行者 株式会社 中外医学社
代表取締役 青木 滋

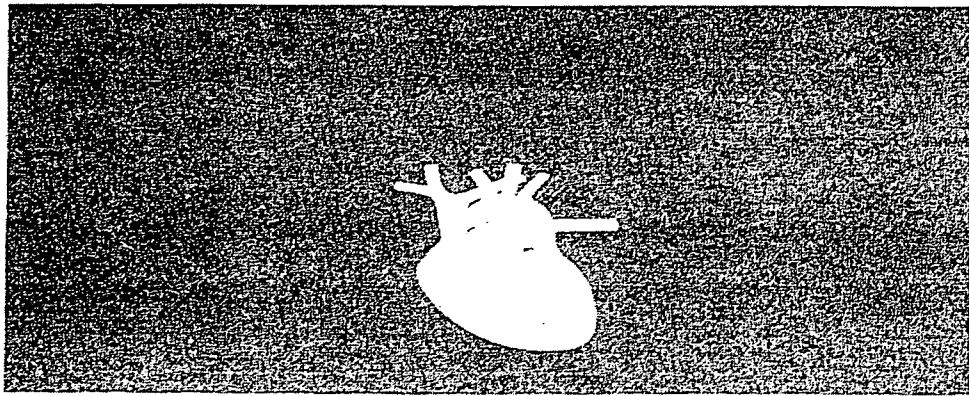
〒162-0805 東京都新宿区矢来町 62
電 話 03-3268-2701(代)
振替口座 00190-1-98814 番

印刷・製本 三報社印刷(株) <MM・YI>

Printed in Japan

ICLS <権利日本著作出版権管理システム委託出版物>

ISBN 978-4-498-03910-0



心臓血管外科 テキスト

編者

龍野勝彦 *Katsuhiko Tatsuno* 【榊原記念病院特命顧問】

重松 宏 *Hiroshi Shigematsu* 【東京医科大学教授】

幕内晴朗 *Haruo Makuuchi* 【聖マリアンナ医科大学教授】

四津良平 *Ryohei Yozu* 【慶應義塾大学教授】

安達秀雄 *Hideo Adachi* 【自治医科大学教授】

中外医学社

21 修正大血管転位

修正大血管転位 congenitally corrected transposition of the great arteries とは、解剖学的な接合関係が右房-左室-肺動脈、左房-右室-大動脈である先天性心奇形である。内臓心房位が正位と逆位の場合がある。

手術適応となることの多い先天性病変は心室中隔欠損、肺動脈狭窄であるが、経過観察中に三尖弁（左側房室弁）閉鎖不全とそれに引き続いて生じる右室（左側心室）機能不全より手術適応となる例も多い。生命予後はこれらの有無と程度が関与する¹⁾。また高度房室伝導障害の発生頻度も高い。本症に対する外科術式としては、機能的修復術 conventional repair と解剖学的修復術 anatomical repair または double-switch 手術が主として選択される。

1. 外科手術に必要な解剖学的特徴

房室伝導系に関しては、原則として房室結節が前方と後方の2個存在し、心房中隔と心室中隔の alignment がずれている本疾患の特徴によって、心室中隔との距離がより短い方の房室結節のみがより下位の伝導系組織（His 束）と接続し、伝導系として機能する。この原則に基づいて、内臓心房位が正位の場合には前方房室結節が機能することが多くなり、心房中隔の前方 limbus が右側房室弁弁輪に達した地点に位置する。これより His 束は線維三角を貫き肺動脈弁弁輪の前方をまわって VSD 辺縁に達し、その上前縁を下降していく。内臓心房位が逆位の場合には、心房中隔と心室中隔の alignment が症例により大きく異なるため機能する房室結節は前方のことも後方のこともある。また両方の結節と心室中隔との距離が近似している場合、両方の結節がそれぞれ His 束を従え VSD 辺縁で sling を形成し、頻拍性不整脈の原因となることがある。

大血管の関係は、内臓心房位が正位の場合、大動脈が左前、肺動脈が右後になる。肺動脈の基部は、正常心の大動脈基部と同様に両方の房室弁と接するが、両房室弁間への wedging が浅い。

冠動脈走行に変異が少なくないが、両方の facing sinus から正常心の鏡像型をとる場合が最も多い。

2. 心内修復術式

1) conventional repair

この術式では合併する病変に対する修復のみを行う。右室/三尖弁の機能が正常の症例がこの適応になりうる。手術術式は anatomical repair に比較してより simple であり、手術手技として低侵襲であるといえる。また心房や心室内の縫合線も少なく、これに起因もしくは関連する遠隔期不整脈の発生頻度が少ないことが期待される。しかしながら、解剖学的接合関係の異常は放置するので、修復術後も解剖学的右室や三尖弁が術前と同様に体血圧に曝される。これらの構造物の機能が長期遠隔期に低下する懸念がある。歴史的にも 1957 年以降 anatomical repair が発表される

1990年までの中心的存在であった。これらの比較的古い時代に報告された conventional repair 後の長期成績は、Fontan 手術後のものと同様に mortality, morbidity とともに 2 相性の曲線を描いて上昇するものであったが²⁾、最近の適応を選んだ conventional repair の中期遠隔成績は良好であり、両者の優劣の判定にはさらに長期の経過観察による比較を必要とする。以下にこれらの病変に対する修復術式について述べる。

a) 心室中隔欠損 ventricular septal defect (VSD)

VSD が存在する場合は血行動態的に unrestrictive なサイズがあり、inlet よりに位置する。到達経路は右房切開、経僧帽弁で可能である。パッチ閉鎖のための針糸は De Leval ら³⁾の提唱するよ
うに、concordant heart と同様に経右房、経右側房室弁（僧帽弁）が最も一般的である（図 3-89）。VSD の前下縁では、VSD 越しに解剖学的右室側の心室中隔に針糸をかけ patch を組織に固定して、残りの部分の運針を解剖学的左室側より進める。His 束の位置は、VSD 辺縁の解剖学的左室側で青白い筋としてしばしば視認可能である。また VSD 越しに三尖弁（左側房室弁）内側乳頭筋の付着部位を確認することが重要で、たとえ軽度の straddling（内側乳頭筋が VSD の辺縁に付着している）であっても、刺激伝導系と三尖弁（左側房室弁）内側乳頭筋の両方の機能を温存することは困難であるため、anatomical repair など他の術式を考慮すべきである。

b) 肺動脈狭窄

VSD と合併する肺動脈狭窄に対する外科的手技を述べる。狭窄部位は弁下部と弁輪低形成、弁尖の可動性低下、およびそれらの組み合わせである。狭窄解除の術式として以下のものから狭窄度や解剖学的左室-肺動脈空間的位置関係に応じて選択する。なお、過度の狭窄解除は解剖学的左室の機能障害とともに、心室中隔の左室側への変位に伴う三尖弁内側乳頭筋の変位によって生じる三尖弁閉鎖不全の発生を招き、むしろ有害である。

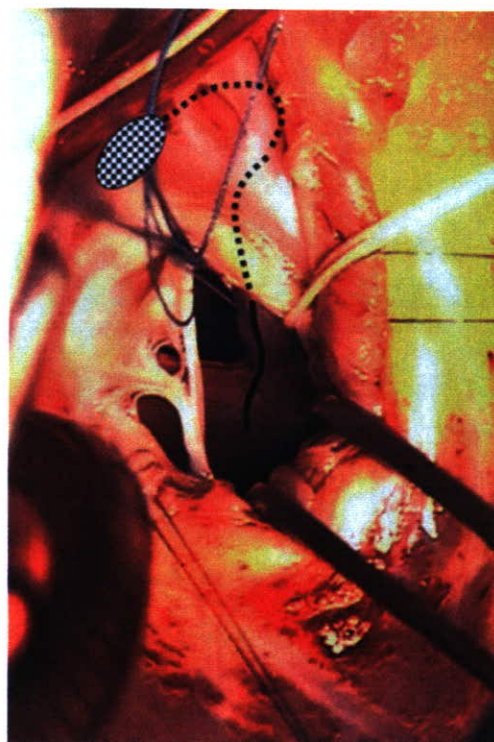


図 3-89 VSD への経僧帽弁到達と房室伝導系損傷を回避する縫合糸の置き方

頭側が上。房室結節と左側 His 束の位置の想像図。

Patch 拡大術は、弁輪径が軽度ないし中等度に小さい場合に適応となる。解剖学的左室流出路-肺動脈弁輪切開線は、右側（解剖学的左）冠動脈を避けて背側に置く方法と、解剖学的左前下行枝と房室間溝の間に置く方法があるが、いずれも左室漏斗部が欠落または低形成となっているために、有効な狭窄解除が可能となる症例は比較的限定される。

心外導管による修復術（Rastelli 型手術）は、最も頻繁に用いられる狭窄解除法である。冠動脈走行の形式により、解剖学的左室流出路切開が不能な場合などに適応がある。筆者⁴⁾は左室心尖部に（心尖部よりではなく）心室切開をおく術式を提唱している（図 3-90）。心室切開を置く前に心室の内側から指で僧帽弁乳頭筋の付着部を確認し、これを避けて切開することが肝要である。この方法では、胸骨との接触を避けて必然的に心外導管は長くかつ弯曲したものになるが、そのために導管の寿命が限定されることはない。

2) anatomical repair (double-switch)

anatomical repair では、discordant な房室関係と discordant な室大血管関係を共に concordant な関係に修復する術式である。複雑な手術手技のために手術時間が遷延するにもかかわらず、非常に良好な早期成績が複数の施設から報告されている^{5,6)}。この術式により、conventional repair で長期遠隔期に潜在的に生じうる解剖学的右室/三尖弁の機能不全を回避するのがねらいである。事実、少なくとも術後 10 年までの遠隔成績は当初の期待に沿う良好なものといえる⁷⁾。適応に関しては施設間で大きなばらつきが存在し、可及的に anatomical repair を行う意見もある一方、心房内血流転換術に伴う洞不全や心房粗細動の発生や上大静脈/肺静脈の再狭窄、Rastelli 型手術に伴う長期遠隔期の mortality および各種 morbidity の発生頻度の高さを懸念する意見もある。この術式の適応が狭い施設においても、解剖学的右室機能不全や三尖弁閉鎖不全に陥った症例、三尖弁構造異常（Ebstein 化や straddling など）の認められる症例で行われる。

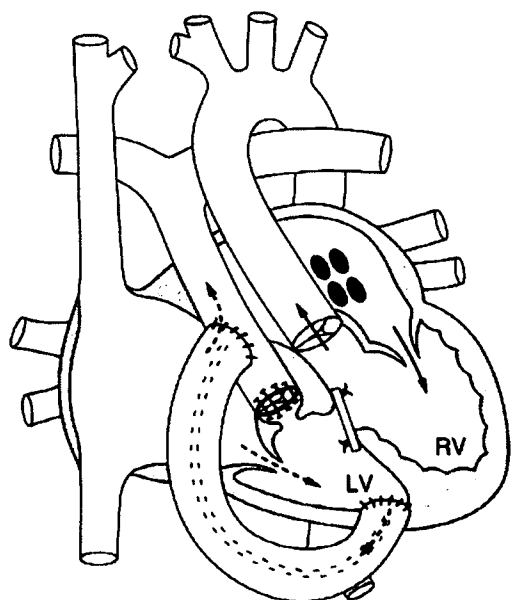


図 3-90 Rastelli 型 conventional repair の模式図

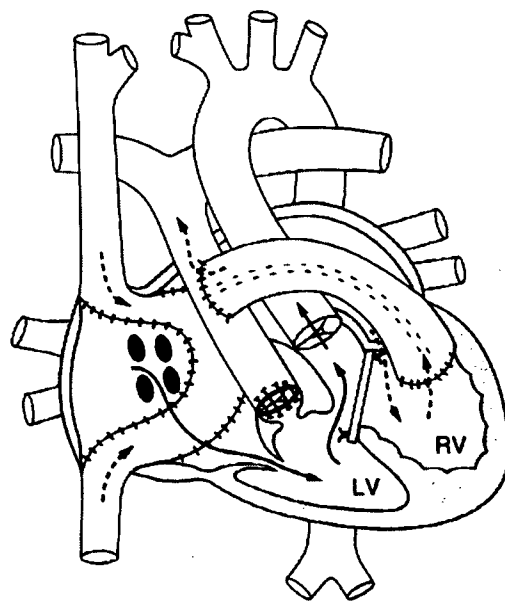


図 3-91 Rastelli 型 anatomical repair の模式図 (Senning 心房内転換術との組み合わせ)

房室関係修復術として Senning, Mustard が, 室大血管関係修復術として arterial switch, Rastelli 型の術式の組み合わせが存在する。なお double-switch という用語には現在混乱がみられ, arterial switch による室大血管関係修復と Senning または Mustard の組み合わせのみを指す専門家と anatomical repair の総称を指す専門家が混在している。

Senning, Mustard の心房内血流転換術をこの疾患に行う場合, 心房中隔の malalignment が必ずみられること, また mesocardia/dextrocardia がしばしば合併することにより, デザインの上で心房切開線や Senning のときの中隔 flap に patch 延長の必要性など, concordant heart の場合のものとかかなり異なることが多い。この潜在的 morbidity を回避するために, hemi-Mustard 法とよばれる, 心房内 baffle を僧帽弁と肺静脈開口部の間にあて下大静脈血を三尖弁口に re-routing し, 上大静脈血は両方向 Glenn shunt をおいて肺動脈と吻合する 1+1/2 心室修復 (one-and-one-half ventricular repair) とする方法も開発されている。

Rastelli 術は肺動脈弁が機能的形態的に異常である場合に選択される (図 3-91)。解剖学的右室からの心外導管の位置は, 胸骨の直下になることを避けて大動脈の左側 (内臓心房位が逆位の場合は右側) を通して肺動脈に渡すことが望ましいが, 肺動脈のサイズや位置により胸骨の直下を横切る形にならざるを得ない場合も多い。

arterial switch を行う場合は, 肺動脈弁が形態的機能的に正常であることが絶対条件であり, 術前の血行動態によってはこれらがマスクされていることがあることに留意する。また冠動脈の走行異常も時々みられ, 特に単一冠動脈で冠動脈の移植が困難になるケースも存在する。

★文 献

- 1) McGrath LB, et al. Death and other events after cardiac repair in discordant atrioventricular connection. J Thorac Cardiovasc Surg. 1985; 90: 711-28.
- 2) Kirklin JW, et al. Congenitally corrected transposition of the great arteries and other forms of atrioventricular discordant connection. In: Cardiac Surgery, 3rd eds. New York: Churchill Livingstone. 2003.
- 3) de Leval MR, et al. Surgical technique to reduce the risks of heart block following closure of ventricular septal defect in atrioventricular discordance. J Thorac Cardiovasc Surg. 1979; 78: 515-26.
- 4) Aeba R, et al. Apico-pulmonary artery conduit repair of congenitally corrected transposition of the great arteries with ventricular septal defect and pulmonary outflow tract obstruction: A 10-year follow-up. Ann Thorac Surg. 2003; 76: 1383-7.
- 5) Ilbawi MN, et al. An alternative approach to the surgical management of physiologically corrected transposition with ventricular septal defect and pulmonary stenosis or atresia. J Thorac Cardiovasc Surg. 1990; 100: 410-5.
- 6) Imai Y, et al. Ventricular function after anatomic repair in patients with atrioventricular discordance. J Thorac Cardiovasc Surg. 1994; 107: 1272-83. Van Praagh R, Papagiannis J, Grunenfelder J, Bartram U, Martanovic P. Pathologic anatomy of corrected transposition of the great arteries: medical and surgical implications. Am Heart J. 1998; 135: 772-85.
- 7) Langley SM, et al. Midterm results after restoration of the morphologically left ventricle to the systemic circulation in patients with congenitally corrected transposition of the great arteries. J Thorac Cardiovasc Surg. 2003; 125: 1229-41.

〈饗庭 了〉

心臓血管外科テキスト ©

発行 2007年9月1日 初版1刷

編著者 龍野勝彦
重松宏
幕内晴朗
四津良平
安達秀雄

発行者 株式会社 中外医学社
代表取締役 青木 滋

〒162-0805 東京都新宿区矢来町 62
電 話 03-3268-2701(代)
振替口座 00190-1-98814 番

印刷・製本 三報社印刷(株) (MM・YI)

Printed in Japan

ICLS (株)日本著作出版権管理システム委託出版物)

ISBN 978-4-498-03910-0



Selective uptake of surface-modified phospholipid vesicles by bone marrow macrophages *in vivo*

Keitaro Sou^a, Beth Goins^b, Shinji Takeoka^a, Eishun Tsuchida^{a,*}, William T. Phillips^b

^aAdvanced Research Institute for Science and Engineering, Waseda University, Tokyo 169-8555, Japan

^bDepartment of Radiology, University of Texas Health Science Center at San Antonio, 7703 Floyd Curl Drive, San Antonio, TX 78229-3900, USA

Received 29 August 2006; accepted 31 January 2007

Available online 20 February 2007

Abstract

An advantage of using vesicles (liposomes) as drug delivery carriers is that their pharmacokinetics can be controlled by surface characteristics, which can permit specific delivery of the encapsulated agents to organs or cells *in vivo*. Here we report a vesicle formulation which targets the bone marrow after intravenous injection in rabbits. Surface modification of the vesicle with an anionic amphiphile; L-glutamic acid, *N*-(3-carboxy-1-oxopropyl)-, 1,5-dihexadecyl ester (SA) results in significant targeting of vesicles to bone marrow. Further incorporation of as little as 0.6 mol% of poly(ethylene glycol)-lipid (PEG-DSPE) passively enhanced the distribution of SA-vesicles into bone marrow and inhibited hepatic uptake. In this model, more than 60% of the intravenously injected vesicles were distributed to bone marrow within 6 h after administration of a small dose of lipid (15 mg/kg b.w.). Histological evidence indicates that the targeting was achieved due to uptake by bone marrow macrophages (BMM ϕ). The efficient delivery of encapsulated scintigraphic and fluorescent imaging agents to BMM ϕ suggests that vesicles are promising carriers for the specific targeting of BMM ϕ and may be useful for delivering a wide range of therapeutic agents to bone marrow.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Nanoparticle; Liposome; Bone marrow; Macrophage; Drug delivery; Surface modification

1. Introduction

Nanoparticulate carrier systems have been investigated as candidates for targeted delivery in cancer therapy and gene therapy [1,2]. A wide variety of nanoparticle systems have been developed for biological applications. One of the advantages of using nanoparticulate materials is based on their controllable surface properties which permit specific interactions with cells, tissues, and organs. Although a number of investigators have demonstrated that endocytosis of nanoparticles *in vitro* is accelerated by surface modification of the particles with specific ligands, the specific *in vivo* targeting of cells remains challenging because it is hindered by competing interactions, especially

fairly high mononuclear phagocyte system (MPS) uptake *in vivo*.

Phospholipid vesicles (liposomes) have been widely investigated as potential carriers for drugs, genes, and proteins because their capsular structure permits encapsulation of various therapeutic agents [2–4]. Because of their particulate nature, these vesicles are trapped in the MPS, particularly hepatic Kupffer cells and spleen macrophages following intravenous administration [5,6]. Once in the bloodstream, the binding of plasma proteins such as immunoglobulins, complement proteins, apolipoproteins, etc., which together are termed “opsonins” on the vesicular surface have been reported to accelerate phagocytosis of the vesicles by macrophages, because the macrophages have scavenger receptors to bind the opsonins [5]. In addition to this mechanism, vesicles containing anionic phospholipids such as phosphatidylserine (PS), which are markers of apoptotic cells, have been reported to bind with a PS receptor on macrophages [7]. Improved vesicles with

*Corresponding author. Tel.: +81 3 5286 3120; fax: +81 3 3205 4740.

E-mail addresses: ksou@waseda.jp (K. Sou), eishun@waseda.jp (E. Tsuchida).

prolonged circulation times preventing MPS uptake have been formulated with poly(ethylene glycol) (PEG) derivatives [8]. These vesicles have been termed as stealth liposomes, due to their ability to evade uptake by the macrophage, particularly Kupffer cells. Long circulating liposomes with PEG surface modification are currently being used as anti-cancer drug delivery agents [9].

On the other hand, the phagocytic ability of the MPS contributes to achieving an active targeting of particulate carriers to macrophages [10,11]. Macrophages produce a wide range of biologically active molecules that are both beneficial and detrimental. Many of the detrimental effects of macrophages are associated with their pro-inflammatory effects. Thus, interventions targeted to macrophages may open new therapeutic approaches for controlling diseases associated with inflammation. Evidence from a number of sources suggests that cancer-associated inflammation promotes tumor growth and progression, and tumor-associated macrophages play a critical role in the initiation, maintenance, and resolution of inflammation [12]. These tumor-associated macrophages are inactivated by mediators from tumor cells, and they serve to promote tumor growth. The importance of macrophages in disease development has led a number of researchers to investigate methods for the site-specific delivery of drugs to macrophages.

Bone marrow, which contains macrophages, is one of the organs responsible for uptake of circulating particulate materials [5,9,13–17]. Also, macrophages associated with erythroblasts in a hematopoietic environment participate in erythropoiesis control, and engulfment of nuclei from erythroid precursor cells [18,19]. The development of drug delivery systems with specific bone marrow targeting may have therapeutic benefits for hematological malignancies as well as hemopoiesis control. However, very little attention has been paid to bone marrow as part of the MPS because its contribution to the overall MPS is generally much less than that of the liver and spleen *in vivo*. Another essential problem for targeting of BMM ϕ is caused by lack of understanding of their specific targeting receptor. Therefore, development of a method for specifically targeting bone marrow will be facilitated by knowledge of the strategies to allow nanoparticles to escape from liver and spleen uptake, but not from bone marrow uptake, and development of specific ligands to induce targeting of bone marrow MPS.

Recently, we have discovered a vesicular formulation which shows remarkable targeting to rabbit bone marrow even when administered at small lipid doses. In this article, we address the components of this vesicle responsible for the targeting of bone marrow and additional vesicular modifications for escaping from liver and spleen uptake, but not from bone marrow. These results may be widely applied to the design of nanoparticulate carriers that target the bone marrow. Bone marrow targeting carriers could open up a wide variety of new therapeutic applications.

2. Materials and methods

2.1. Materials

1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) and cholesterol (CH) were purchased from Nippon Fine Chemical Co. Ltd. (Osaka, Japan); 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[monomethoxy poly(ethylene glycol) (5000)] (PEG-DSPE) was purchased from NOF Co. (Tokyo, Japan). L-glutamic acid, *N*-(3-carboxy-1-oxopropyl)-, 1,5-dihexadecyl ester (SA) was synthesized as previously reported [20]. Glutathione was purchased from Sigma (St. Louis, MO). Superoxide dismutase (SOD) was purchased from Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Osaka, Japan). 4,4-difluoro-5-methyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-dodecanoic acid (C₁-BODIPY C₁₂) and Texas Red (TR) sulfonyl chloride were purchased from Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR).

2.2. Preparation of vesicles

All vesicle preparations were performed under sterile conditions. DPPC and CH (1:1 molar ratio), or DPPC, CH, and SA (1:1:0.2 molar ratio) were dissolved in benzene and lyophilized to lipid powders. The mixed lipid powder was hydrated with a glutathione (30 mM) and NaCl (120 mM) solution (pH: 7.0) at 5 g dL⁻¹, and submitted to three cycles of freeze-thawing. After controlling vesicle size by an extrusion method (final pore size of the filter: 0.22 μ m, Fuji microfilter, Fuji Photo Film Co., Tokyo, Japan), the unencapsulated glutathione was removed by three ultracentrifugation steps ($3 \times 10^5 g$, 60 min each) and the vesicles were dispersed in saline solution. Surface modification with PEG was performed by making use of the spontaneous incorporation of PEG-DPSE into vesicles [21]. Various concentrations of the PEG-DSPE dispersion were added to the vesicle dispersion and the mixture incubated at 37 °C for 3 h. The vesicle dispersion was ultracentrifuged ($3 \times 10^5 g$, 60 min) to remove unincorporated PEG-DSPE in the supernatant. After washing the precipitated vesicle pellet by ultracentrifugation ($3 \times 10^5 g$, 60 min), the PEG-modified vesicles (PEG-vesicles) were dispersed in saline at 7 g dL⁻¹, and the dispersion was then passed through a sterilized membrane filter (pore size 0.45 μ m, DISMIC filter 45, ADVANTEC). The amount of PEG-DSPE incorporated was determined from the peak area ratio of methylene protons of PEG-DSPE (3.63 ppm) to the choline methyl protons of DPPC (3.39 ppm) using ¹H-NMR spectroscopy (JEOL JNM-LA500) [21]. SA-vesicles containing 0.3, 0.6, 1.4, and 2.6 mol% of PEG-DSPE on the surface (represented as PEG(0.3)-, PEG(0.6)-, PEG(1.4)-, and PEG(2.6)-[SA-Ve], respectively) and control vesicles containing 2.6 mol% of PEG-DSPE (represented as PEG(2.6)-Ve) were prepared and characterized for these studies. The diameter of the resulting vesicles was determined with a COULTER submicron particle analyzer (N4SD, Coulter, Hialeah, FL), and represented as an average diameter \pm standard deviation (SD). Endotoxin contamination was determined to be below 0.1 EU/mL by the Limulus assay test [22].

2.3. Technetium-99m (^{99m}Tc)-labeling of vesicles

Radiolabeling of vesicles was performed according to a method described previously [14,17,23,24]. A saline solution of sodium [^{99m}Tc]pertechnetate (5 mL, 2.78 GBq (75 mCi)) (GE Healthcare Radiopharmacy, San Antonio, TX) was injected into a vial containing lyophilized hexamethylpropyleneamine oxime (HMPAO; 0.5 mg, SnCl₂; 7.6 μ g) (CeretekTM; GE Healthcare, Arlington, IL). The mixed solution was incubated for 5 min at room temperature. The ^{99m}Tc-HMPAO solution (1 mL) was then added to the vesicle dispersion ([lipids] = 7 g dL⁻¹, 1 mL), and the resulting mixture was incubated for 1 h. After removing free ^{99m}Tc-HMPAO by gel filtration (Sephadex-G25 column), total radioactivity was measured in a dose calibrator (Radex, Mark 5 Model, Houston, TX) and the labeling efficiency was calculated as the percentage of radioactivity in ^{99m}Tc-vesicles to radioactivity measured just before gel filtration.

2.4. Labeling stability of ^{99m}Tc -labeled vesicles *in vitro*

Labeling stability was examined *in vitro* according to a previously reported procedure [25]. Prepared ^{99m}Tc -labeled vesicle dispersions (0.5 mL) were mixed with rabbit serum (1.5 mL) and incubated at 37 °C to check the labeling stability. A 100 μL aliquot of incubated sample at 24 and 48 h after mixing was passed through a Bio Gel A-15m (200–400 mesh) spin column. The sample was eluted by sequential addition of 100 μL of Dulbecco's phosphate-buffered saline (pH 7.3) under the centrifugal force of 1000 rpm for 1 min. Each fraction was collected separately and counted in a scintillation well counter (Canberra multichannel analyzer; Canberra Industries, Meriden, CT). Another 100 μL aliquot of incubation sample was used as a standard. The sum total of activity eluted with vesicle fractions was compared with total radioactivity in the standard. As for ^{99m}Tc -labeled PEG(0.6)-[SA-Ve], the labeling stability was also examined in human plasma at 37 °C for 24 h.

2.5. Animal experiments

Animal experiments were performed under the National Institutes of Health Animal Use and Care guidelines and approved by the University of Texas Health Science Center at San Antonio Institutional Animal Care Committee. Male New Zealand White rabbits (2–3 kg, $n = 3$ –4 per each vesicle formulation) were anesthetized with an intramuscular injection of ketamine/xylazine (both from Phoenix Scientific, St. Joseph, MO) mixture (50 and 10 mg/kg body weight (b.w.), respectively). One ear of a rabbit was catheterized with a venous line, and the other ear was catheterized with an arterial line. ^{99m}Tc -vesicles were infused into the venous line at 1 mL/min and blood samples were drawn from the arterial line. Each rabbit received a total dose of 214.6–377.4 MBq (5.8–10.2 mCi) ^{99m}Tc -activity and 15 mg/kg b.w. of lipids. As a control study, ^{99m}Tc -HMPAO solution (3 mL) was mixed with glutathione solution (30 mM, 3 mL), and the mixed solution was infused into the venous line at 1 mL/min in rabbits. Each rabbit received a total dose of 321.9–399.6 MBq (8.7–10.8 mCi) ^{99m}Tc -activity.

2.6. Imaging study

Rabbits were placed in the supine position under a Picker (Cleveland, OH) large-field-of-view gamma camera using a low-energy all-purpose collimator and interfaced with a Pinnacle imaging computer (Medasys, Ann Arbor, MI). One-minute dynamic 64 \times 64 pixel scintigraphic images were acquired over a continuous period of 1.5 h after the injection of ^{99m}Tc -vesicles. Static images were also acquired at various times post-injection. The image analysis was performed using a nuclear medicine analysis workstation (Pinnacle computer; Medasys, Ann Arbor, MI). The regions of interest were drawn around images of the whole body, one femur, liver, and spleen. The radioactivity counts were decay-corrected at each time, and converted to a percentage of whole body counts. Corrections were made for the blood pool contribution of each organ using the percent injected dose (%ID) measured immediately after infusion.

2.7. Blood persistence and biodistribution

Blood was collected from the arterial line of the rabbit (100 μL) at various times post-injection. The radioactivity of blood samples was quantified in a scintillation well counter (Canberra Multichannel Analyzer, Meriden, CT) during the same counting session. The counts at each time were converted to the percentage of the counts in the sample collected immediately after injection. The animals were rapidly sacrificed at 6 or 24 h and the tissue samples were collected, weighed and counted for radioactivity in the same scintillation well counter for calculation of biodistribution. To calculate the %ID per organ, total blood volume, muscle and skin mass were estimated as 5.7%, 45%, and 10% of total body weight, respectively [26,27]. Bone mass was estimated to be 12 times that of one femur [28].

2.8. Microscopic study

Histological examination of fluorescence delivered into bone marrow tissues was performed using PEG(0.6)-[SA-Ve], double fluorescently labeled by encapsulating SOD conjugated by TR sulfonyl chloride (TR-SOD) in inner aqueous phase and embedding C_1 -BODIPY C_{12} in bilayer membrane. Conjugation of TR-SOD to SOD was performed according to previously reported procedure [29], and purified TR-SOD was encapsulated in mixed lipids including 1 mol% of C_1 -BODIPY C_{12} to obtain the double fluorescently-labeled PEG(0.6)-[SA-Ve] with size of 247 ± 22 nm in diameter. Labeled vesicles were *i.v.* injected into anesthetized Male New Zealand White rabbits (2.5 kg, lipids: 15 mg/kg b.w.). At 6 h after injection, femoral bone marrow tissues, liver and spleen were taken, fixed in 10% formalin solution, and then sliced into sections. The sections were fixed on the glass slides with agar at 4 °C and examined with a confocal scanning microscope (Olympus IX-70). Transmission electron microscopic (TEM) observation was performed to observe the bone marrow tissues at a higher magnification. PEG(0.6)-[SA-Ve] were *i.v.* injected into anesthetized Male New Zealand White rabbits (2.5 kg). The rabbits received 15 mg/kg b.w. of lipids. Control rabbits received no injection. Bone marrow was taken from the left femur of rabbits at 6 h after injection of vesicles, and fixed in 2.5% glutaraldehyde solution. The fixed bone marrow was then washed with 0.1 mol/L phosphate buffer, pH 7.4, and stained with 2% osmic acid solution at 4 °C for 2 h. The organs were first dehydrated stepwise with ethanol, and then polymerized using Quetol 812 at 60 °C for 28 h. The obtained samples were sliced into sections by using an Ultracut S microtome. The sliced samples were stained with 3% uranyl acetate solution for 20 min and then treated with Satoh's lead solution (lead acetate, lead nitrate, and lead citrate) in citrate for 5 min, washed, and dried. The sample was observed and a picture taken with a transmission electron microscope (TEM, H-7500, Hitachi, Tokyo, Japan).

2.9. Theoretical estimation

The theoretical estimation for surface coverage by PEG on vesicles has been reported previously [30,31]. At low grafting densities of PEG, the chains of grafted-PEG are displayed "mushrooms", in which area A_{PEG} covered by each molecule is theoretically calculated as

$$A_{\text{PEG}} = \pi R_{\text{F}}^2, \quad (1)$$

where the Flory radius R_{F} is given by

$$R_{\text{F}} = N^{3/5} a, \quad (2)$$

where N is the degree of polymerization, a is the size of a monomer.

The percentage of covered surface area by PEG in the mushroom conformation R was estimated as

$$R = A_{\text{PEG}} \times M / A_{\text{lipid}}, \quad (3)$$

where M is the mole percentage of PEG-DSPE and A_{lipid} is the average area of total membrane lipids. In subsequent calculation, we used $N = 114$ and $a = 0.35$ nm for PEG (M_w 5000), and $A_{\text{lipid}} \approx 0.4$ nm² for average area as mixed membrane of DPPC and CH (1:1 molar ratio) [32].

2.10. Statistical methods

Values are reported as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed using Microsoft Excel for Windows. Biodistribution data were compared using the Student's unpaired *t*-test. A *p*-value < 0.01 or 0.05 was considered statistically significant.