

ステントを留置する群(CAG群)と、CAG所見に加えFFRが0.80以下の病変にのみステントを留置する群(FFR群)に無作為に割り付けた<sup>6)</sup>。予想通り、FFR群では使用ステント数が少なかったが、1年の追跡期間中の死亡もしくは心筋梗塞の発生率はFFR群のほうがCAG群よりも低く(7.3 vs 11.1%)、これに再血行再建術施行率を加えた複合エンドポイントも同様であった。

COURAGE試験とその後の解析の意味するところは、(i)安定狭心症における積極的脂質低下療法を含む十分な薬物療法の重要性和、(ii)リスクの層別化の重要性であろう。すなわち、まず抗血小板薬、降圧薬、ACE阻害薬、スタチンなどを含む十分な薬物療法を開始すべきであり、十分な薬物治療にもかかわらず重症の心筋虚血が誘発される場合には、PCI、冠動脈大動脈バイパス移植術(Coronary artery bypass graft: CABG)などの血行再建術の追加を考慮する。また、経過中に急性冠症候群に移行する症例や、左主幹部病変、3枝病変などの重症病変症例、左心機能低下例などのハイリスク症例もこれに含まれると考えられる。

### ② J S A P 試験

一方、2008年には我が国からJ S A P (Japanese Stable Angina Pectoris) 試験が発表され、COURAGE試験と一見相反する結果に注目が集まった<sup>7)</sup>。この試験では、

左前下行枝冠状動脈(LAD)近位部を除く1枝病変と2枝病変の安定狭心症患者384人を、PCIを先行させて薬物療法を行う群(PCI群)と、薬物療法のみを行う群(薬物群)に無作為に割り付けし、中央値で3.3年間追跡した。注目すべきは、死亡と急性冠症候群(多くは不安定狭心症)の発生率が、PCI群のほうが薬物群よりも低かったことである(2.9 vs 3.9%)。日本人のしかも比較的低リスク患者を対象とした本試験の結果は、COURAGE試験の結論とは相容れないように思われる。この背景には、(i)我が国で広く普及している血管内超音波(IVUS)ガイド下でのきめ細かいPCIでは、初期成功率のみならず遠隔期のイベント発生率が低いこと、(ii)日本人では元々ステント血栓症が少ないこと、(iii)仮説であるが、PCIによりプラークが安定化して急性冠症候群を起こしにくくなる可能性、などが考えられるが、この検証には日本人を対象としたさらに大規模な研究が待たれる。

### ③ B A R I - 2 D 試験

2009年6月には、2型糖尿病(DM)を合併するCAD患者を対象として、十分な薬物療法に血行再建術を追加する意義を検証したBARI-2D試験の結果が発表された<sup>8)</sup>。この試験デザインは複雑で、2型DMとCADを合併する患者2368人を、まず、主治医の判断により適切な血行再建術としてPCI

Iを選択した群(PCI群)と、CABGを選択した群(CABG群)に分けた。さらに各群を、十分な薬物療法を行った上で、ただちに血行再建術(PCIかCABG)を行う群(血行再建群)と、十分な薬物療法のみで観察する群(薬物群)に無作為に割り付けた。さらにこの4群を、インスリン療法を行う群と、インスリン抵抗性改善療法を行う群に割り付け、合計8群を5年間追跡した。血行再建術としてのPCIとCABGは、主治医が適切と判断するほうを選択しているため、無作為に割り付けではなく、PCIとCABGの優劣は比較できない。

結果は、血行再建群と薬物群の間、およびインスリン療法群とインスリン抵抗性改善療法群の間のいずれにおいても、全死亡率および死亡・心筋梗塞・脳卒中からなる複合エンドポイントに差がなかった。しかし、CABGが選択された763人のサブグループの解析では、血行再建群のほうが薬物群よりも複合エンドポイント(死亡・心筋梗塞・脳卒中)の発生率が低く(22.4 vs 30.5%)、特に、インスリン抵抗性改善療法を受けている群で最も低かった。

本試験の対象は、(i)CAGで50%以上の狭窄病変があり、かつ負荷試験陽性の患者と、(ii)70%以上の狭窄があり、かつ狭心症状がある症例であり、全員が心筋虚血がある可能性の高い患者である。また、CABGとPCI



は主治医の判断で選択されているため、CABG群には多枝病変などのハイリスク症例が、PCI群には比較的ローリスクの患者が多い傾向がある。したがって、ハイリスク症例では、ただちに血行再建術(CABG)を行うことにより心血管イベント(特に心筋梗塞)を抑制することができると可能性が高い。この結果は2009年9月の欧州心臓病学会(ESC)で発表されたSYNTAX試験(本誌4428号に詳述)の2年間の追跡結果や、PCIとCABGを比較した無作為割り付け試験のメタ解析の結果とも整合する<sup>9)</sup>。

これらの報告でも、PCIのほうが再血行再建術施行率が高いことは当然としても、左主幹部病変や3枝病変などのハイリスク(SYNTAX scoreが高い)症例では、CABGのほうが死亡率や心筋梗塞発生率が低いとされた。

一方、比較的低リスクの患者では、たとえ心筋虚血が存在する可能性が高くても、すでに十分な薬物療法を受けていれば、ただちにPCIを追加することの意義は少ないと思われる。しかし、本試験においても薬物群の40%の患者が5年の追跡期間中にPCIなどの血行再建術を追加されていることを考慮すると、CORAGE試験の結果と同様に、定期的なPCIの意義を否定するものではない。

④薬剤溶出性ステント

2007年のNew England Journal of Me-

dicine誌に、薬剤溶出性ステント(DES)はベアメタルステント(BMS)に比較してステント血栓症が多く、留置6カ月以降の死亡と心筋梗塞発生率が高いとする結果が複数報告され、大きな衝撃を全世界に与えた<sup>11)12)</sup>。しかし、その後の長期追跡結果やメタ解析では、DESとBMSで死亡率に差がないことが示された<sup>13)14)</sup>。シロリムス溶出性ステント(SES、サイファー<sup>®</sup>)は、4年の追跡期間におけるステント血栓症の発生率がBMSと差がなく、心筋梗塞発生率はむしろBMSより低かったが、パクリタキセル溶出性ステント(PES、タキサス<sup>®</sup>)は、留置30日以降のステント血栓症発生率がBMSやSESに比較して高いことが報告された<sup>13)</sup>。

2009年春より、国内三番目のDESであるゾタロリムス溶出性ステント(ZES、エンデバー<sup>®</sup>)が使用可能となった。2009年9月のTCT(Transcatheter Cardiovascular Therapeutics)学会では、このZESとPESを比較したENDEAVOR IV試験の留置後3年の追跡結果が報告された。ZESは、新生内膜増殖による遠隔期内径損失(Late loss)が他のDESに比較して大きいことが報告されていたが<sup>15)16)</sup>、死亡と心筋梗塞発生率はPESよりも低く、死亡・心筋梗塞・標的血管血行再建術(TVR)からなる複合エンドポイントも低い傾向にあった。

また、2009年のTCT学会では、20

10年2月に我が国でも使用可能になる見込みのエベロリムス溶出性ステント(EES、ザイエンスV<sup>®</sup>)に関しても、注目すべき結果が報告された。EESとPESを1年間追跡比較したSPIRIT IV試験では、EESはPESに比較してLate lossが約2分の1と小さく、これを反映してTVRはPESに比較して低かった。また、心血管死亡率に有意差はないものの、心筋梗塞発生率はPESよりも低く(1.8 vs 2.9%)、これはステント血栓症発生率が著しく少ないためと考えられた(0.29 vs 1.06%)。

ZES、EESなどの新世代のDESは、第一世代のPESよりも慢性期の心筋梗塞発生率が低いが、これにはLate lossは関連しない。このことは、ステント治療の予後を左右するのは新生内膜の厚さやそれに伴う再狭窄ではなく、血管内皮機能が重要である可能性を示唆する。

⑤プロトンポンプ阻害薬(PPI)とチエノピリジン系抗血小板薬の併用

ステントを用いた治療後には、アスピリンと、クロピドグレルなどのチエノピリジン系薬剤による2剤併用抗血小板療法が必須であるが、一方で、消化管出血などの合併症を増加させるため、予防的なPPIの処方幅広く行われている。しかし、クロピドグレルは、CYP2C19による代謝により活性代謝産物に変化して薬理作用を発揮するため、CYP

2C19を阻害する作用を有するPPIを併用すると、その抗血小板作用が減弱することが報告されている<sup>17)</sup>。また、我が国ではCYP2C19の機能が低下する遺伝子多型が多く、クロピドグレルの効果弱いと考えられる症例が多いことも報告されている。

2009年3月にJAMA誌に発表された観察研究では、急性冠症候群後にクロピドグレルを処方された8205人を、PPIを併用した群と併用しなかった群と比較すると、死亡または急性冠症候群の発生率がPPI併用群で高く、しかも、処方期間が長いほど発生率が高かった<sup>18)</sup>。しかし一方で、9月に発表された二つの無作為割り付け試験(PRI NCIPLE-TIMI44, TRITON-TIMI38)の結果に基づいた報告では、PPIとクロピドグレル、または新しいチエノピリジン系薬剤であるラスグレールとの併用により、心血管死・心筋梗塞・脳卒中の心血管イベント発生率は増加しないとした<sup>19)</sup>。

このような背景の下に、11月に米国食品医薬品局(FDA)は、クロピドグレルにPPIの1剤であるオメプラゾールを併用すると、血小板凝集抑制作用が減弱すると、両者の併用をしないように警告(warning)を出した。AHAはただちに声明を発表し、「今回の警告は、心血管イベント発生率を検証した臨床試験に基づくものではない」として反論しているが、今後のFDAの動向と我が国

における対応を注視する必要がある。

FDAは、オメプラゾールと同様にCYP2C19を阻害する可能性のある薬剤として、シメチジン、チクロピジンなどを挙げているが、オメプラゾール以外のPPIについては十分な情報がないとしている。また、クロピドグレル服用患者においては、制酸薬やシメチジン以外のH<sub>2</sub>ブロッカーも使用できるとしている。一方、ラスグレールは、薬理作用発現のためにCYP2C19による代謝を必要としないためPPI併用の影響が少なく、しかもクロピドグレルよりも心血管イベント抑制効果が大きいとされる<sup>20)</sup>。海外ではすでに上市されているが、我が国においては現在治療が進行中であり、早期に使用可能となることが期待される。

### (3) 二次予防—COSMOS試験

欧米人のCAD患者を対象とした試験や、日本人でも急性冠症候群患者を対象とした試験では、積極的脂質低下療法により冠動脈プラーク体積が縮小するという報告は以前にもあった<sup>21)</sup>。2009年3月に発表されたCOSMOS試験では、高コレステロール血症を合併する急性冠症候群ではない安定期CAD患者に、術前と術後76週にIVUS検査を行いプラーク体積を計測した<sup>22)</sup>。この間にLDLコレステロールは平均140から82mg/dlに低下し、それに伴いプラーク体積は5.1%減少した。この結果は、日本人の安定期C

AD患者においても積極的脂質低下療法を行うと、プラークの安定化のみならず退縮が期待できることを示し、現行ガイドラインにおけるCAD二次予防のための治療目標である「100mg/dl未満」よりもさらに低い目標を目指す治療も支持されるものと考えられる。

(山下 學史)

□□□□ 敬□□□

(併刊の記載はすべて2009年—以下同)

- 1) Miller JM, et al : N Engl J Med 359 : 2324, '08.
- 2) Blumenthal DA, et al : Circulation 118 : 586, '08.
- 3) 津野田雅敏, 他 : 医師のあゆみ 229 : 124. '04
- 4) Boden WE, et al : N Engl J Med 356 : 1503, '07.
- 5) Shaw LJ, et al : Circulation 117 : 1283, '08.
- 6) Tonino PA, et al : N Engl J Med 360 : 213. '08.
- 7) Nishigaki K, et al : JACC Cardiovascular Interv 1 : 469, '08.
- 8) BARI 2D Study Group : N Engl J Med 360 : 2503. '09.
- 9) Serruys PW, et al : N Engl J Med 360 : 961. '09.
- 10) Hlatky MA, et al : Lancet 373 : 1190. '09.
- 11) Stone GW, et al : N Engl J Med 356 : 998, '07.
- 12) Lagerqvist B, et al : N Engl J Med 356 : 1009, '07.
- 13) Stettler C, et al : Lancet 370 : 937, '07.
- 14) James SK, et al : N Engl J Med 360 : 1933. '09.
- 15) Miyazawa A, et al : Am Heart J 155 : 108, '08.
- 16) Stone GW, et al : Circulation 119 : 680. '09.
- 17) Kushner FG, et al : Circulation 120 : 2271. '09.
- 18) Ho PM, et al : JAMA 301 : 937. '09.
- 19) O'Donoghue ML, et al : Lancet 374 : 989. '09.
- 20) Wiviott SD, et al : Lancet 371 : 1353, '08.
- 21) Okazaki S, et al : Circulation 110 : 1061, '04.
- 22) Takayama T, et al : Circulation 119 : 2110.

2. 心不全

(1) 急性心不全に対する薬物療法

心不全治療におけるβ遮断薬の地位はますます高まってきているが、個々の症例においては使用法が難しいことが少なくない。B-CONVINCED試験<sup>1)</sup>によると、心不全の急性増悪時にβ遮断薬を継続投与しても入院期間は同等であり、3カ月後のβ遮断薬投与量はβ遮断薬中止群より多かった。OPTIMIZE-HF試験<sup>2)</sup>の結果と合わせれば、急性増悪時にもβ遮断薬を中止しないほうがよいと言える。

DAD-HF試験<sup>3)</sup>によれば、非代償性の急性心不全に対して低用量ドパミン(5mg)と120mg/日のフロセミドの併用療法は、480mg/日のフロセミドのみ使用するより腎機能低下が有意に少なく、より大規模の試験が待たれる。

(2) 駆出率の低下した慢性心不全に対する

薬物療法

① β遮断薬

慢性心不全の治療にはカルベジロールが使用されることが多いが、薬効の持続性、コンプライアンス、使用量、選択の根拠などについてさらなる詳細な情報が必要であろう。CASPERR試験<sup>4)</sup>によれば、1日1回投与でよいカルベジロールCR(徐放錠)は、よりよい服薬コンプライアンスを有し、副作用は同

等であった。COMPARE試験<sup>5)</sup>においても、CRは同等の左室ネガティブリモデリングを認めた。カルベジロールの用量比較試験

であるJ-CHF試験(プロトコルは文献<sup>6)</sup>)が2009年、AHA late-breaking clinical trialsで発表され、1日2・5mg、5mg、20mgの3群間にイベント発生率の差はなかったが、患者数が不足しており、これをもって低用量でもよいという結論には至らなかった。カルベジロールとビソプロロールの比較試験CIBISELD(プロトコル論文<sup>7)</sup>)が、ESC Heart Failure Meeting 2009で発表され、有効性は同等であった。フシンドロールはβ<sub>1</sub>受容体の遺伝子多型により有効性に大きな差があるが<sup>8)</sup>、β<sub>2</sub>受容体の遺伝子多型もその有効性に大きな影響を与えることが分かった<sup>9)</sup>。

② ACE阻害薬、ARB

ロサルタンの用量依存性を検討したHEAL試験<sup>10)</sup>によると、高用量群のイベント抑制率が高いという結果が得られた。ARBに関して用量依存性を検討した試験は少なく、他の薬剤での検討を待ちたい。

③ スタチン

CORONA試験の後ろ向き解析<sup>11)</sup>で、高感度CRPをマーカーとして0・2mg/dlを基準に2群に分けて解析すると、CRP高値の患者群ではロスバスタチンがイベント抑制に有効であった。pleiotropic effect(多面的

効果)による可能性がある。

④ comorbidity(併存疾患)に対する治療

心不全患者において、うつ状態が独立した予後規定因子となることが報告されている<sup>12)</sup>。しかし、SADHART-CHF試験<sup>13)</sup>によると、抗うつ薬セルトラリンに心不全の予後改善効果はなかった。心筋梗塞後のうつ状態と併せて治療法の工夫が必要な分野である。

その機序はともかく、心不全には貧血を伴うことが少なくない。静注の鉄剤で心不全患者の貧血を治療したFAIR-HF試験<sup>14)</sup>によれば、QOLは改善した。エリスロポエチンの効果と併せて、予後に与える影響は今後の検討を待ちたい。

(3) 駆出率の保たれた慢性心不全(CHF)に対する薬物療法

SENIORS試験<sup>15)</sup>において、HFPEFに対してネビボロールは収縮不全に比べて同等の効果を有したと報告されたが、駆出率35〜45%程度の軽度収縮不全のある患者をEJOPDの中に組み込んでおり、駆出率45%以上の患者に対しての有効性は明確でない。同様に、駆出率45%以上のHFPEF患者に対してイルベサルタンを投与したIIPRESERVE試験<sup>16)</sup>では、有効性を検出できなかった。すでにACE阻害薬が投与されていた例が含まれていたこと、投与期間の問題などが指摘されているが、拡張不全に対する薬物療法の困難さを示している。

(4) 心室再同期療法(CRT)

REVERSE試験<sup>17)</sup>において、ニューヨーク心臓病学会(NYHA)心機能分類I-II度の収縮不全患者(QRS幅120 msec以上)に対してCRTを施行した場合、1年後左室のネガティブリモデリングが観察された。また、MADIT-CRT試験<sup>18)</sup>において、心室再同期治療除細動器(CRT-D)は植え込み型除細動器(ICD)単独よりNYHA I-II度の収縮不全患者(QRS幅130 msec以上)に対して4・5年間の長期予後を有意に改善した。軽症の収縮不全患者でもQRS幅が120 msec以上ある場合には、CRT-Dの植え込みが推奨される可能性がある。

(5) 補助人工心臓

現在、我が国では体外式のTOYOBO型補助人工心臓のみ保険適用であるが、すでに体内埋め込み式のHeartMate I<sup>®</sup>、EVAH EART<sup>®</sup> DuraHeart<sup>®</sup>、Jarvik2000<sup>®</sup>の臨床試験が終了しており、順次保険償還されることが期待されている(HeartMate Iはその後HeartMate XVE<sup>®</sup>)。拍動流はHeartMate XVE<sup>®</sup>連続流はHeartMate II<sup>®</sup>の比較試験の結果が発表されたが<sup>19)</sup>、すべての指標においてHeartMate IIが優り、今後の主流になるといえると思われる。我が国においてもHeartMate IIの臨床試験がまもなく開始される予定である。

(6) 心臓移植

2009年11月末現在での国内心臓移植累積例数は65例である。2009年7月に臓器移植法が改正され(2010年7月施行)、家族の同意のみでドナー提供できることになった。また、年齢制限もなくなり、乳幼児への移植の道も拓かれた。しかし、2009年度は現在6例に留まっており、ドナー不足はきわめて深刻である。2008年のイスタンブール宣言<sup>20)</sup>を考えると、今後海外渡航移植はきわめて厳しい情勢にあると考えられ、国内移植体制の整備が急務である。

(綿川弘一郎)

□□文 献□□□

- 1) Jondeau G, et al : Eur Heart J 30 : 2186. 2) Fonarow GC, et al : J Am Coll Cardiol 52 : 190. 3) Giamouzis G, et al : J Card Fail 15 (abstr) : 815. 4) Udelson JE, et al : J Card Fail 15 : 385. 5) Greenberg BH, et al : J Card Fail 14 (abstr) : 796. 6) Okamoto H, et al : Nippon Rinsho 65 (Suppl 4) : 537. 7) Dungen HD, et al : Clin Res Cardiol 97 : 578. 8) Liggett SB, et al : Proc Natl Acad Sci USA 103 : 11288. 9) Bristow MR, et al : Circ Heart Fail 3 : 21. 10) Konstam MA, et al : Lancet 374 : 1840. 11) McMurray JJ, et al : Circulation 120 : 2188. 12) Kato N, et al : J Card Fail 15 : 912. 13) O'Connor CM, et al : J Card Fail 14 (abstr) : 797. 14) Anker SD, et al : N Engl J Med 361 : 2436. 15) van Veldhuisen DJ, et al : Am Coll Cardiol 53 : 2150. 16) Massie BM, et al : N Engl J Med 359 : 2456. 17) St John Sutton

M, et al : Circulation 120 : 1858. 18) Moss AJ, et al : N Engl J Med 361 : 1329. 19) Slaughter S, et al : N Engl J Med 361 : 2241. 20) The Declaration of Istanbul on organ trafficking and transplant tourism : Transplantation 86 : 1013. 08.

3. 不整脈

不整脈分野については、心房細動に関する報告が圧倒的に多く見られた。

(1) 心房細動

心房細動に対するupstream治療として、ACE阻害薬やARBの有効性が報告されているが、バルサルタン投与群と偽薬群で心房細動再発率を検討したGISSI-AF試験<sup>1)</sup>では、両者に差は見られず、upstream治療の有効性を証明することができなかった<sup>1)</sup>。観察期間が1年と短く、ARBによるリバーシブルモデリングが不十分であった可能性はあるが、upstream治療の有効性と限界については、今後十分な検討が必要と思われる。

心房細動に合併する血栓塞栓症の予防には主にワルファリンが用いられるが、PT-INR測定を頻回に要すること、多彩な相互作用があることなど、使用上多くの難点がある。このため、適応がありながらワルファリン治療を受けていない患者が予想外に多いことが従来より指摘されていた。経口トロンビン阻害薬であるキシメラガラタンはワルファリンに代わりうる薬剤として期待されたが、肝機

能障害の頻度が予想以上に高いことが判明し、実用的とは言えなかった<sup>2)</sup>。

このような背景の下に、新たな経口トロンビン阻害薬ダビガトランの効果を、脳梗塞のリスクを有する心房細動を対象として検討したREILLY試験の結果が報告された。これによるとダビガトラン高用量群では有効性はワルファリンに勝り、合併症の頻度は同等であった。さらに低用量群では有効性はワルファリンと同等で、合併症はより少なかった。肝機能障害も稀で、今後大いに期待できる薬剤と考えられる<sup>3)</sup>。

脳梗塞のリスクがあるにもかかわらずワルファリンが使用できない場合には、やむをえずアスピリンが単独で用いられることが一般的である。ACTIVE試験では、アスピリンとクロピドグレルとの併用投与の効果が検討されたが、出血性合併症の頻度は若干高くなるものの、アスピリン単独投与群と比較して脳梗塞の発症が28%減少した<sup>4)</sup>。

非薬物療法では、経皮的左心耳閉鎖術が注目される。WATCHMAN<sup>®</sup> device (Atritech社、米国)のワルファリンに対する非劣性を検討したPROTECT-AF試験では、ワルファリンと同等の塞栓予防効果が得られた。周術期合併症こそあるものの、今後用いられる機会が増加するであろう<sup>5)</sup>。

心房細動に対するカテーテルアブレーションが急速に普及しつつある。A4試験では、

112例の発作性心房細動を対象としてアブレーションと薬物治療の有効性が比較された。3カ月経過した時点で、薬物治療群では63%、アブレーション群では9%で治療方針のクロスオーバーが行われた。1年間の観察後、無再発率は薬物治療群23%、アブレーション群89%であり、運動耐容能やQOLの点でもアブレーション群が優れていた<sup>6)</sup>。

新しいデバイスに関する報告も盛んになされている。佐竹らが開発したhot balloon catheterを用いた検討では、初回治療のみで抗不整脈薬非投与下に92%で洞調律が維持された<sup>7)</sup>。症例数は比較的少数であるが、laser balloon catheterを用いた検討では、初回治療のみで抗不整脈薬非投与下に60%で洞調律が維持された。ただし、心タンポナーデ、後遺症のない脳梗塞、無症候性横隔神経麻痺が各1例見られたという<sup>8)</sup>。そのほか、cryo balloon<sup>9)</sup>やHDM (high-density mesh ablator) catheter<sup>11)~13)</sup>も注目される。

一方で、心房細動におけるアブレーションでは致死合併症が生じうることも忘れてはならない。Cappatoら<sup>14)</sup>の報告によれば、546施設で施行された4万5115件のアブレーションにおいて32例の死亡が見られた(1000例当たり1例)。さらにイリゲーションカテーテルは、4mm電極カテーテルと比較して2.5倍のリスクがあるという。本邦でも最近イリゲーションカテーテルが保険償

還され、使用頻度が高まるものと思われるが、使用に際しては十分な注意が必要であろう。

## (2) QT延長症候群

最も頻度が高い遺伝性QT延長症候群はKCNQ1に変異を有するLQTS1であり、この型ではβ遮断薬が有効であることが知られているが、その実態は明らかとは言えなかった。β遮断薬治療が行われたLQTS1症例を平均10年追跡したVincentら<sup>15)</sup>の報告によれば、β遮断薬開始後75%の症例で症状が消失し、心停止ないし突然死が発生した例では、90%以上が服薬状況不良ないしはQT延長作用を有する薬剤を服用していたという。少なくともLQTS1に関しては、早期診断とβ遮断薬治療がきわめて重要であることを改めて示したものと考えられる。

従来、QT延長症候群の頻度は1.2万〜1.5万と報告されているが、Schwartzら<sup>16)</sup>が生後15〜25日の新生児約4万5000例の心電図を検討したところ、17例がQT延長症候群と診断され、罹患率は少なくとも1.2534と推定された。遺伝性不整脈の頻度は、従来考えられていたより意外と高いのかもしれない。

## (3) 植え込み型除細動器(ICD)

心臓突然死の二次予防におけるICDの有効性については疑問の余地がないほどに確立された感があるが、一次予防に関しては不明の点が多い。SCD-HeFT試験のサブ解析か

らは、1年死亡率が20%を超える重症例ではICD植え込みは予後を改善しなかったとの報告があった<sup>17)</sup>。また、Ghanbari<sup>18)</sup>はメタアナリシスの結果から、重症心不全を有する女性では、一次予防を目的としたICD植え込みは生存率を改善しなかったと報告した。そのほか、植え込み時合併症について、女性に男性よりリスクが高いという報告<sup>19)</sup>、心不全治療が十分でない傾向が見られたといった報告<sup>20)</sup>がなされている。心臓突然死の一次予防におけるICDの適応に関しては、まだ検討の余地が多く残されていることは明らかであり、さらに今後は性差についても考慮する必要性が生じてきたものと考えられる。

(安喰 恒輔)

□■文 献 □■

- 1) GISSI-AF Investigators, et al : N Engl J Med 360 : 1606. 2) Diener HC, et al : Cerebrovasc Dis 21 : 279, 06. 3) Connolly SJ, et al : N Engl J Med 361 : 1139. 4) ACTIVE Investigators, et al : N Engl J Med 360 : 2066. 5) Holmes DR, et al : Lancet 374 : 534. 6) Jais P, et al : Circulation 118 : 2498, '08. 7) Sohara H, et al : Circ Arrhythm Electrophysiol 2 : 225. 8) Reddy VY, et al : Circulation 120 : 12. 9) Siklody CH, et al : J Cardiovasc Electrophysiol 20 : 1197. 10) Chun KRJ, et al : J Cardiovasc Electrophysiol 20 : 1203. 11) De Filippo P, et al : J Cardiovasc Electrophysiol 20 : 367. 12) Steinwender C, et al : J Cardiovasc Electrophysiol 20 : 147. 13) De Greef Y, et al : Pacing Clin Elec-

trophysiol 32 : 1286. 14) Cappato R, et al : J Am Coll Cardiol 53 : 1798. 15) Vincent GM, et al : Circulation 119 : 215. 16) Schwartz PJ, et al : Circulation 120 : 1761. 17) Levy WC, et al : Circulation 120 : 835. 18) Ghanbari H, et al : Arch Intern Med 169 : 1500. 19) Peterson PN, et al : Circulation 119 : 1078. 20) Russo AM, et al : J Cardiovasc Electrophysiol 20 : 973.

#### 4. 肺高血圧症

肺高血圧症の成因を大別すると肺動脈性肺高血圧症(PAH)と慢性血栓塞栓性肺高血圧症(CTEPH)・左心不全・肺疾患などによるものに二分される。

##### (1) PAH

2008年、第4回ワールドシンポジウムが開かれ、新たな肺高血圧症分類が提唱・発表され<sup>1)</sup>、治療のガイドラインも新たに示された<sup>2)</sup>。PAHの分類では、家族性PAHを遺伝性と改名し、具体的な遺伝子異常で細分化している。また、肺静脈閉塞性疾患/肺毛細管腫症を別に分類するなど若干の変化が見られたが、大筋に変化はない。

治療ではEARLY試験<sup>3)</sup>にて効果が示されたこともあり、エンドセリン(ET)受容体拮抗薬がWHO II度の患者にも第一選択薬とされている点<sup>4)</sup>が最も大きな変更点であった。日本でも現在、WHO II度の患者にボセentanを使用するオープンラベル試験が進行

中である。また、ETA受容体選択的拮抗薬アンプリセタンは、すでに日本での第III相試験を終了し、承認待ちの状態である。アンプリセタンにおいて選択的拮抗薬の有益性は臨床的には示されていないが<sup>4)</sup>、シルデナフィルなど他の薬剤との相互作用が少ないことや(可逆的)肝障害が比較的小さいとされている。実際に筆者らも、肝障害のためボセentanをやむなく中止した症例にアンプリセentanを導入できた経験がある。

また、長時間作用型ホスホジエステラーゼ5阻害薬タグラフィルが発売開始となった。先行販売されたシルデナフィルとの大きな違いとして、1日1回の服薬であることや眼科的な副作用が少ないことが挙げられる<sup>5)</sup>。こういった薬剤が続いて、いくつかの臨床試験が日本でも行われている。Rhoキナーゼ阻害経口薬(ファスジル)<sup>6)</sup>、可溶性グアニル酸シクラーゼ刺激経口薬(リオシグアト)<sup>8)</sup>といった新薬や、すでに欧米で使用されているプロスタサイクリン経皮/静注薬(トレプロスタニル)、慢性骨髄性白血病治療薬である受容体チロシンキナーゼ阻害薬(イマチニブ)<sup>7)</sup>といった薬剤である。今後、このような薬剤を用いた治療により、PAH治療は大きく多彩に変化することが予想される。

##### (2) CTEPH

臨床的にしばしば見られる肺高血圧としてCTEPHが挙げられる。手術治療困難な非

中枢性CTEPHには、これまで特別に有効な治療薬がなく、臨床的にはPAH治療薬を応用するに過ぎなかった。ボセンタン<sup>9)</sup>やシルデナフィル<sup>11)</sup>が有効とも報告されたが、重症例に対する効果は十分とは言えない。近年、重症CTEPH患者に対し経皮的肺動脈形成術が有効であると、欧米<sup>12)</sup>に続き本邦でも報告されている。ターゲット血管を絞ることによって過度の侵襲を避け、ほぼ必発する血管形成術後肺水腫のコントロールを十分に行うことで、長期に肺動脈圧低下が達成されるといえるものである。現在、治療法のない重症CTEPH患者を救命する有効な治療法となりうるのか、今後の結果が待たれている。

(八尾 厚史)

□□文 献□□

1) Simonneau G, et al: J Am Coll Cardiol 54: 543.  
2) Barst RJ, et al: J Am Coll Cardiol 54: 578. 3) Galie N, et al: Lancet 371: 2093, 08. 4) Hrometz SL, et al: Ann Pharmacother 42: 1653, 08. 5) Montani D, et al: Adv Ther 26: 813. 6) Fukumoto Y, et al: Nippon Rinsho 66: 2091, 08. 7) Blaukovitsch M, et al: Recent Pat Cardiovasc Drug Discov 4: 142. 8) Belik J: Curr Opin Investig Drugs 10: 971. 9) Jais X, et al: J Am Coll Cardiol 52: 2127, 08. 10) Vassallo FG, et al: Eur J Intern Med 20: 24. 11) Suntharalingam J, et al: Chest 134: 229, 08. 12) Feinstein JA, et al: Circulation 103: 10, 01. 13) Pitton MB, et al: Rofo 175: 631, 03.

5. 心エコー

心エコーの分野では新技術を用いた臨床研究の結果が多く報告された。リアルタイム3次元経食道心エコー法(3DTEE)は、僧帽弁のen face viewを高画質で描出することにより、僧帽弁形成術中の複雑病変の診断<sup>1)</sup>や、弁置換術後の人工弁輪縫合不全の診断と治療方針の決定<sup>2)</sup>に2次元経食道心エコー法(2DTEE)よりも有用であることが報告された。冠動脈以外のカテーテルインターベンションでは、3DTEEが心腔内カテーテルの全長、目標病変の全貌およびカテーテル先端のデバイスとの相対的位置関係を同時に描出できるため、カテーテル操作のガイド役として、2DTEEに対する優位性が確立された。Amplatzer<sup>®</sup>デバイスによる心房中隔欠損孔閉鎖術<sup>3)</sup>、カテーテルによる大動脈弁植え込み術<sup>5)</sup>と僧帽弁位人工弁縫合不全の閉鎖術<sup>2)</sup>などの治療に3DTEEが活用される。

2D speckle tracking法(2DST)を用いた研究も多い。2DSTでは、肉眼では難しい左室の円周および長軸方向の運動も評価可能である。Tanら<sup>6)</sup>は、左室駆出率(EF)が正常の心不全患者(HFNEF)において、収縮期のradialとlongitudinal strain、僧帽弁輪速度S<sub>1</sub>、心尖部のrotationが低下しており、しかも運動負荷によりこれらの指標の増加が

不良であると報告し、Liuら<sup>7)</sup>はHFNEF患者において、global longitudinal peak systolic strainとS<sub>1</sub>が低下していることを報告した。これらの研究でHFNEF心では収縮障害も同時に存在することが示された。これまで「単独の拡張不全」や「拡張不全は収縮不全より先に出現する」という概念が存在したのは、収縮機能をEFという感度の低い指標で評価し、拡張機能を高感度の指標で評価していたためと考えられる。

心筋虚血の診断においては、Ishiiら<sup>8)</sup>がsin-chemic memory(虚血の記憶)に着目し、2DSTで拡張早期の心筋strainの変化率(diastolic index)を計測し、運動負荷後の心筋虚血検出に有用であることを示した。さらに心筋虚血後のdiastolic stunningが長時間持続することも報告し<sup>9)</sup>、今後外来における症状消失後の虚血歴の確認への応用が期待される。さらに最新の報告では3D speckle tracking法の臨床応用が可能になり<sup>10)</sup>、2Dエコーの弱点であるthrough plane(心臓の上下前後の動きによって目標が断面から一時消える)現象の克服に有望と思われる。

一方、古典的な方法として、左室流入血流速Eと組織ドプラ法の拡張期僧帽弁輪運動速度E<sub>1</sub>の比E/E<sub>1</sub>による肺動脈楔入圧(PCWP)推定が近年汎用されてきたが、高度の収縮低下や左室拡大および心室再同期療法(CRT)を受けている場合は、E/E<sub>1</sub>とP

CWPが相関しない報告<sup>12)</sup>が出ており、今後これらの症例への応用に注意が必要である。

(宇野 漢成・竹中 克)

□□文 読□□

- 1) Grewal J, et al : J Am Soc Echocardiogr 22 : 34.
- 2) Kronzon I, et al : J Am Coll Cardiol 53 : 1543.
- 3) Perk G, et al : J Am Soc Echocardiogr 22 : 865.
- 4) Taniguchi M, et al : J Am Soc Echocardiogr 22 : 1114.
- 5) Janosi RA, et al : Minim Invasive Ther Allied Technol, Jan 1 [Epub ahead of print].
- 6) Tan YT, et al : J Am Coll Cardiol 54 : 36.
- 7) Liu YW, et al : J Card Fail 15 : 782.
- 8) Ishii K, et al : J Am Coll Cardiol 53 : 698.
- 9) Ishii K, et al : J Am Coll Cardiol 54 : 1589.
- 10) Seo Y, et al : Circ Cardiovasc Imaging 2 : 451.
- 11) Saito K, et al : J Am Soc Echocardiogr 22 : 1025.
- 12) Mullens W, et al : Circulation 119 : 62.

## 6. CT・MRI

高時間分解能を必須の前提条件とする心臓CTは、回転速度の高速化、ヘリカルアルゴリズムの導入、検出器の多列化により実用化された。あたかも被写体をX線管球内に収めるといふ独創的発想に基づき、すでに1979年に50msの時間分解能を実現していた電子線超高速CTは別格として、X線管球とこれに対向する検出器からなる機械的回転方式では、回転時間350ms、検出器64列、3心拍segmentsのhalf再構成法をもって、58msの

時間分解能と0.5mmの空間分解能が達成されている。現在、このタイプが臨床・研究用MDCT (multiple detector row CT)としての世界標準である。

心臓CTの成果として近年注目すべきものは、2組のX線管球と対向検出器を直角をなすよう搭載したdual-source CTの臨床応用である<sup>1)</sup>。half 180度再構成が90度回転分のデータにより可能となるため、時間分解能の半減に成功している。さらに64列検出器を5器体軸方向に二次元配置した我が国発信のADCT (area detector CT) (64列×5:320列)の出現は圧巻である。体軸方向へ160mmあるFOV (field of view)により心臓全体を同時走査するため、もはやヘリカルアルゴリズムは無用となり、1心拍で心臓の四次元データが取得される。2心拍segments法により、88msの時間分解能と被ばく線量の低減に成功している。

一方、心臓MRIでは、最大傾斜磁場40mT/m、α度パルス繰り返し時間4msの装置が第一線の標準規格となつて以来、特筆すべきハード面での進歩は見られていない。FOV 280mm、7心拍7segmentsの信号収集とすれば、空間分解能2mm、時間分解能80msの画像が標準的となる。phase encoding方向に有効配置された複数コイルによる同時信号収集 (parallel acquisition technique: PAT) は、コイル数 (PAT factor) に応じ、空間分

解能か時間分解能かの改善が可能である。例えばPAT factor 2であれば、臨床目的に応じ、1mmの空間分解能か40msの時間分解能かのいずれかを優先させることになる。心臓MRI領域の最近の研究成果として、理論上S/N向上が期待される3.0Tの高静磁場装置による臨床報告が散見される<sup>2)</sup>。心臓CTと比べ、より非侵襲性が高い点で有利な心臓MRIは適応範囲が広く、空間分解能の改善が今後の臨床需要拡大の鍵を握っている。

(鈴木 順一)

□□文 読□□

- 1) Donnio R, et al : Am J Radiol 192 : 1051.
- 2) Yang Q, et al : J Am Coll Cardiol 54 : 69.

## 7. 大血管疾患

腹部大動脈瘤 (AAA) の成因には未だ不明の点が少ない。ノルウェーにおいて4345名を1994年より7年間前向きに調査した。超音波で発見したAAAの発生率は0.4%/年であった。リスクとして喫煙の影響が大きく (オッズ比13.72)、その他、高コレステロール血症、低HDLコレステロール、高血圧が有意であった。AAAと動脈硬化のリスク因子は密接に関連している<sup>1)</sup>。一方、大動脈瘤の成因において炎症の関与の重要性がますます指摘されている。

その細胞内機序として MMP (matrix me-

talloproteinase)-9 の役割が注目されている。MMP-9 の作用を抑制して動脈瘤の進行を減少させる薬物として、ドキシサイクリンが動物実験ではその有効性が証明されている。

Lindemanら<sup>2)</sup>は60例のAAAの修復を予定されている患者を4群に分け、ドキシサイクリンの0、50、100あるいは300mg/日を術前に2週間投与した。手術時に大動脈切片を採取し、MMP-9を測定したところ、そのタンパク量は減少していたがmRNAには変化がなかった。同時に好中球、cytotoxic T cellが減少し、炎症性サイトカインであるIL-6やIL-18あるいは転写因子(AP-1、C/EBP、STAT3)も減少した。

AAAにおけるMMP-9の増加は好中球の浸潤の影響が強く、瘤の伸展抑制にドキシサイクリンの有用性が示唆された。AAAの手術に際してAHA/ACC(米国心臓病学会)のガイドラインでは、リスクが低い患者で4Mets以上の運動耐容能があれば、術前の冠動脈疾患(CAD)の精査は不要とされている。Takigawaら<sup>3)</sup>は、201例の周術期リスクの低いAAA患者の冠動脈評価をしたところ、無症候性のCADが29.4%に存在し、その半数は多枝病変であった。適切な治療により予後の悪化はなかったことから、術前の冠動脈評価は慎重であらねばならない。

スタンフォードB型大動脈解離後の降圧の

重要性は言うまでもないが、心拍数のコントロールの効果については十分なエビデンスがない。Kodamaら<sup>4)</sup>は、171例の大動脈解離の急性期心拍数を60拍/分以下とそれ以上の群とに分けて経過を追ったところ、心拍数の軽重な減少群の大動脈イベントの発生率が有意に低かった(オッズ比0.25)。

このような大動脈瘤あるいは解離は、マルファン症候群においても重大な合併症である。本症で大動脈径の増加例の薬物治療としては、もっぱらβ遮断薬が用いられてきたが、本症の原因遺伝子の一つであるフィブリリン-1の変異がTGFβの活性化に影響し、それが種々の結合織の脆弱性に関わっていることが確かめられてきた。TGFβの活性を抑制する薬物としてACE阻害薬あるいはARBが期待されるが、事実、Brookeら<sup>5)</sup>のグループは18例の小児マルファン症候群例にロサルタンあるいはイルベサルタンを投与して1〜4年間経過観察したところ、ARBの投与によって大動脈基部の直径の増加速度が3.54から0.46mm/年に有意に抑制されることを報告した。

Pilopら<sup>6)</sup>はマルファン症候群例の大動脈瘤組織のプロテオームを解析したところ、Eip min AのC末端フラグメントが増加しており、このことはカルパイン活性の増加を示唆するとしている。もしそうであればカルパイン活性も一部ARBで抑制されるので、本症

へのARBの投与の一つの根拠となるであろう。少なくともフィブリリン-1の遺伝子変異型のマルファン症候群においては、TGFβ活性が亢進していると考えられる。それが血中濃度に反映されれば診断の助けになる。Mattaら<sup>7)</sup>は、フィブリリン-1ノックアウトマウスならびにマルファン症候群患者で血中の総TGFβ濃度を測定して、いずれも対照に比し、高値を示すことを報告した。特に本症患者では健常者より6倍も高かった。薬物療法との関係では、ARBばかりでなくβ遮断薬投与例においても未治療者よりTGFβ濃度は低下していた。再現性がある結果が得られるなら、マルファン症候群の臨床指標として有用と考えられる。

(平田 恭信)

□□□× 読□□□

1) Forsdahl SH, et al: Circulation 119: 2202. 2) Lindeman JH, et al: Circulation 119: 2209. 3) Takigawa M, et al: Circ J 73: 1203. 4) Kodama K, et al: Circulation 118(14 Suppl): S167, '08. 5) Brooke BS, et al: N Engl J Med 358: 2787, '08. 6) Pilop C, et al: Circulation 120: 983. 7) Matt P, et al: Circulation 120: 526.

# Diameter, Length, and Direction of Pedicle Screws for Scoliotic Spine

## Analysis by Multiplanar Reconstruction of Computed Tomography

Katsushi Takeshita, MD,\* Toru Maruyama, MD,† Hiroataka Chikuda, MD,\* Naoki Shoda, MD,\*  
Atsushi Seichi, MD,\* Takashi Ono, MD,\* and Kozo Nakamura, MD\*

**Study Design.** A morphometric study of thoracic and lumbar spine in scoliosis.

**Objective.** The purpose of the present study was to evaluate the appropriate values of diameter, length, and direction of pedicle screws with a straightforward trajectory in scoliosis.

**Summary of Background Data.** Several authors have analyzed the pedicle shape and evaluated the feasibility of pedicle screws in the scoliotic spine. To date, however, none of them have reported analysis by multiplanar reconstruction of computed tomography.

**Methods.** Computed tomography with a thickness of 1.25 mm was obtained before surgery in 41 Japanese with scoliosis. A total of 1100 pedicles were evaluated by simulating screw placement with the straightforward approach in a multiplanar reconstruction image. We chose the optimal slice where the insertion point and direction were determined to get the largest diameter of a screw in every vertebra. Length from the insertion point to the tip of the simulated screw was measured.

**Results.** Screws of L1 and L2 were significantly smaller than those of T12 and L3 ( $P < 0.001$ ). On the concave side, 37% of T3–T9 pedicles did not accept a 4-mm diameter screw even with 25% expansion. Length on the convex side was shorter at T5 and T7–T9 than that on the concave side ( $P < 0.05$ ). On the convex side, 11% at T4–T8 vertebrae did not accept a 25-mm length screw. Average angle of screws of T1, T2, and L5 was greater than 15° and 17% of the screws at T7–T10 were placed in the lateral direction.

**Conclusion.** In T3–T9 on the concave side, pedicle screws with a straightforward trajectory are not held within 37% of pedicles even with plastic deformation. We recommend that surgeons consider combined use of various types of anchoring when preoperative evaluation reveals narrow pedicles for screw placement.

**Key words:** scoliosis, pedicle screw, multiplanar reconstruction, computed tomography. **Spine 2009;34:798–803**

Pedicle screws are now the dominant anchorage in posterior instrumentation. It is preferred that they are placed inside vertebrae for the safety of vital tissues around the

From the \*Department of Orthopaedic Surgery, The University of Tokyo, Tokyo, Japan; and †Department of Orthopaedic Surgery, The Saitama Medical Center, Saitama, Japan.

Acknowledgment date: May 6, 2008. Revision date: July 15, 2008. Acceptance date: July 17, 2008.

The manuscript submitted does not contain information about medical device(s)/drug(s).

No funds were received in support of this work. No benefits in any form have been or will be received from a commercial party related directly or indirectly to the subject of this manuscript.

Address correspondence and reprint requests to Katsushi Takeshita, MD, Department of Orthopaedic Surgery, Faculty of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan 113-8655; E-mail: Takeshita-ort@h.u-tokyo.ac.jp

spine. Several authors analyzed the pedicle shape and evaluated the feasibility of pedicle screws in the thoracic spine.<sup>1–5</sup>

Tilting and rotation of the scoliotic spine hinder surgeons from understanding its precise shape. Computed tomography (CT) scan is an ideal technique, but a gantry can be aligned only in the sagittal plane and not in the frontal plane. Therefore, all vertebrae except the apical ones are transected obliquely. A tilt of over 10° in the coronal plane resulted in the inaccurate measurement of the pedicle diameter in scoliosis.<sup>6</sup> Acquisition volumes of magnetic resonance imaging (MRI) can be adapted to an individual spinal curvature and 2 investigators adopted MRI to analyze the morphometry of pedicles in scoliosis.<sup>1,3</sup> However, MRI depicts cortical structures with less clarity and precision. CT with multiplanar reconstruction enables investigators to set an arbitrary gantry in any plane for each vertebra and to analyze a clear bony shape. To date, however, no researcher has morphometrically analyzed the scoliotic spine by multiplanar reconstruction of CT.

### Purpose

The purpose of the present study was to evaluate the appropriate values of diameter, length, and direction of pedicle screws with a straightforward technique in scoliosis from analysis of multiplanar reconstruction of CT.

### Materials and Methods

Forty-one Japanese with scoliosis were recruited: the condition was idiopathic in 23 patients, Chiari malformation in 5, Noonan syndrome in 1, tuberous sclerosis in 1, and multiple epiphyseal dysplasia in 1. There were 34 women and 7 men with an average age of 17.4 years (10–29 years). The Cobb angle of the main curve ranged 50° to 100° (average, 65.7°). Curve classification by Lenke *et al*<sup>7</sup> was type 1 in 13 patients, type 2 in 11, type 3 in 2, type 4 in 4, type 5 in 4, and type 6 in 7. Proximal or cephalad fractional curves at the thoracic spine were right-convex in 2 curves and left-convex in 26. Main thoracic curves were right-convex in 33 and left-convex in 5. Thoracolumbar/lumbar or caudal fractional curves were right-convex in 6 and left-convex in 34.

Preoperative CT with a slice thickness of 1.25 mm was obtained for computer-assisted surgery. All CT files were transferred to a personal computer and analyzed by a DICOM viewer program (ExaView LITE; Ziosoft, Tokyo, Japan). All parameters were measured by the first author (K.T.) who exclusively handles DICOM files for navigation surgery in scoliosis at the University of Tokyo Hospital. Window level and diameter were optimized for the measurement of bony struc-

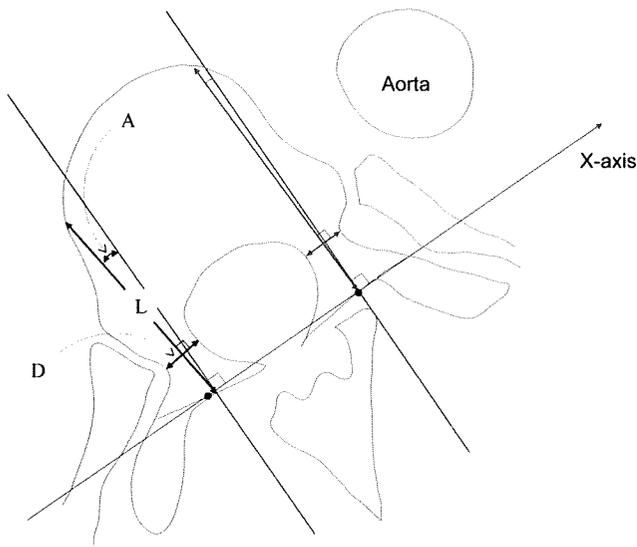


Figure 1. Diameter (D), length (L), and angle (A) of simulated pedicle screws in a transverse plane. The abscissa-axis is determined by connecting both of the middle points of the superior facet base. Diameter is set to obtain the largest value among multiple true-orthogonal axial images in individual vertebra.

ture. Among various techniques available for pedicle screw placement, we chose the straightforward technique because of its prevalence and its biomechanical superiority over the anatomic technique.<sup>8</sup> Three parameters of diameter, length, and angle on both sides of a pedicle were measured in a true-orthogonal image of each vertebra. We chose the optimal slice where an insertion point and direction were determined to get the largest diameter of a screw in every vertebra. We measured diameter in the transverse plane (Figure 1) as well as diameter in the coronal plane at the outer cortex of a pedicle. Shorter one was adopted. Length from the insertion point to the tip of the simulated screw was measured. For description of the angle, we defined a new Cartesian coordinate system. A line connecting both sides of the middle of the superior facet base was defined as the abscissa-axis. Angle was measured with reference to the ordinate-axis, with a positive value when a screw was aimed at the vertebral body.

We analyzed 1100 pedicles from T1 to L5 vertebrae after excluding those pedicles outside the curves. Each parameter at 1 side was compared with a value on the contralateral side. Statistical analysis was performed with unpaired *t* test. Difference was regarded as significant when a value was below  $P = 0.05$ . Intraobserver and interobserver interclass correlation coefficients (ICCs) in 3 parameters were calculated in 30 vertebrae of 2 patients.

■ Results

**Diameter**

All screws except a few in T1 and L5 had shorter diameter in the axial image than in the coronal image (Table 1). Diameter of the screws decreased in the middle thoracic spine. Screws of L1 and L2 were significantly smaller than those of T12 and L3 ( $P < 0.001$ ). The diameter of T2–T10 on the concave side was significantly shorter than that on the convex side ( $P < 0.01$ ) (Figure 2). Sixty-two percent of the concave T3–T9 screws were less than 4 mm and 37% did not hold a 4-mm diameter

**Table 1. Diameter of Pedicle Screws (From the Outer Cortex of Pedicles)**

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
<b>Concave</b>									
Mean	6.0	4.9	3.3	2.7	3.0	3.5	3.7	3.8	4.1
SD	1.1	1.0	1.3	1.1	1.2	1.1	1.1	1.2	1.3
Min	4.1	3.3	0.5	0.8	0.6	1.4	1.6	1.4	1.8
Max	7.9	6.5	5.7	4.4	5.0	6.7	6.7	6.3	7.2
N	24	28	30	32	33	34	35	36	37
<b>Convex</b>									
Mean	6.3	5.5	4.7	4.3	4.5	4.4	4.6	4.6	4.9
SD	0.9	0.9	0.9	0.9	0.8	1.0	0.8	0.8	1.0
Min	4.6	3.8	2.8	2.4	3.0	2.3	2.7	2.3	3.3
Max	8.8	7.0	6.2	6.0	7.2	7.0	6.1	5.9	8.2
	T10	T11	T12	L1	L2	L3	L4	L5	
<b>Concave</b>									
Mean	5.2	6.7	6.8	5.8	6.3	7.8	9.0	9.1	
SD	1.2	1.4	1.5	2.0	1.7	1.3	1.3	1.0	
Min	2.9	3.7	3.8	2.6	3.3	5.7	6.9	7.3	
Max	7.8	8.9	10.0	10.9	11.5	10.8	11.5	10.5	
N	39	40	40	41	36	32	22	11	
<b>Convex</b>									
Mean	6.0	7.2	7.1	5.6	5.9	7.4	8.7	10.0	
SD	1.2	1.8	1.6	1.5	1.4	1.3	1.8	1.5	
Min	3.6	3.6	2.3	3.2	2.5	3.9	5.6	8.1	
Max	8.4	11.0	10.0	9.8	8.6	10.1	12.2	12.1	

SD indicates standard deviation; min, minimum value; max, maximum value.

screw even with 25% expansion ( $4.0/1.25 = 3.2$  mm) (Figure 3). Our data indicates that pedicles of right T3–T5 in the proximal thoracic curve and those of left T4–T9 in the main thoracic curve do not hold a 4-mm diameter screw in a typical right thoracic curve. Diameter of the screw at the main curve did not correlate with the Cobb angle nor with a patient’s age (correlation coefficient, 0.039;  $P = 0.82, 0.13; P = 0.55$ ).

**Length**

Length of screws decreased at the middle thoracic spine as shown in Table 2. All but 1 vertebra accepted a 20-mm length screw. Eleven percent of T4–T8 vertebrae on the convex side required screws shorter than 25 mm. The length required on the convex side were shorter at T5 and T7–T9 than that on the concave side ( $P < 0.05$ ) (Figure 4).

**Angle**

Screws were aimed in the medial direction in the upper thoracic and lower lumbar spine (Table 3) and the average angle of screws of T1, T2, and L5 was greater than 15°. Seventeen percent of screws at T7–T10 were aimed in the lateral direction (Figure 5). Angles on the concave side did not significantly differ from those on the convex side ( $P = 0.08$ ).

ICC of diameter was 0.957 (2-sided 95% confidence interval: 0.929–0.974) in the intraobserver measurement and 0.929 (0.864–0.961) in the interobserver measurement. ICCs of length and angle were 0.936 (0.895–0.961) and 0.922 (0.972–0.952) in the intraobserver measurement and 0.932 (0.889–0.959) and 0.896 (0.829–0.937) in the interobserver measurement.

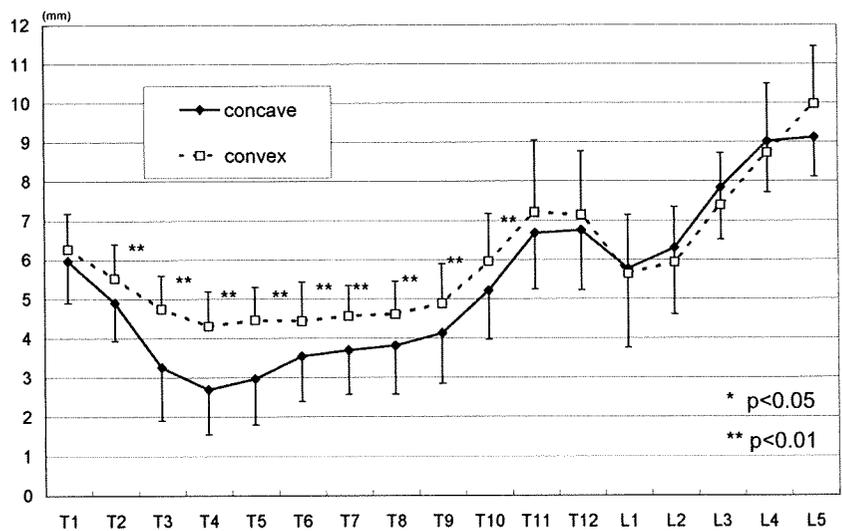


Figure 2. Diameter of pedicle screws.

■ Discussion

**MRI Versus CT**

Liljenqvist *et al* reported 2 fine analyses of pedicle morphology with scoliosis and revealed smaller pedicles on the concave side. In their CT study,<sup>2</sup> tilt of an individual vertebra was partially resolved by sagittal tilting of gantry in 29 patients with idiopathic scoliosis. Liljenqvist *et al* did not adopt multiplanar reconstruction because the 3-mm interval was too large and reconstruction processing would result in an inaccurate value. In the present study, CT data were obtained with a diameter of 1.25 mm for the navigation surgery in which the accuracy and measurement of MPR images are guaranteed. Second, Liljenqvist *et al* analyzed a pedicle shape in 26 patients using MRI which compensated the tilting in scoliosis.<sup>3</sup> Concurrently, an inherent issue of analyzing bony structures by MRI emerged.

Both of the Liljenqvist's studies measured the inner cortical width of a pedicle; we chose to measure the outer width for 2 reasons. One was ease of measurement because of the clearer border of the outer cortex. Especially in a thin pedicle, the inner surface of the cortex was obscure

even in CT. That may be the reason for disagreement at the upper thoracic spine between the present study and Liljenqvist's MRI study, though the outer cortical diameter in the present study largely agreed with the inner cortical diameter in 2 reports of Liljenqvist. Second is an elastic characteristic of a pedicle.<sup>5,9,10</sup> We agree with O'Brien *et al*s suggestion<sup>5</sup> of measuring the outside pedicle dimension by taking plastic deformation into account.

**Diameter**

Our present data suggested that a large proportion of thoracic pedicles on the concave side were too small to accept the 4-mm diameter screw. Even if a pedicle allows 25% enlargement as Rinella *et al* reported,<sup>9</sup> the outer diameter should be over 3.2 (=4.0/1.25) mm. The present data suggests that 37% (88/237) of concave T3–T9 pedicles will be fractured if a screw for the thoracic spine is placed in them.

One possible solution may be to use the anatomic trajectory, although a screw placed by the anatomic trajectory is biomechanically weaker than one placed by the straightforward trajectory.<sup>8</sup> Moreover, the screw-head

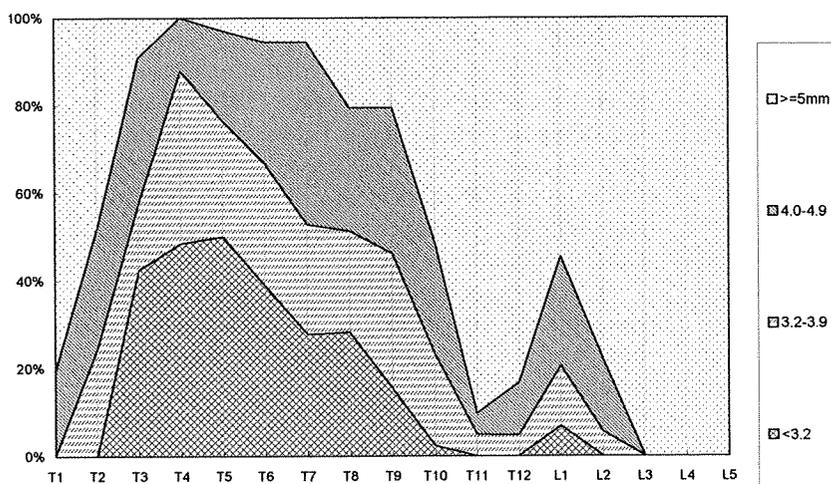


Figure 3. Bimodal distribution of diameter of pedicle screws on the concave side.

**Table 2. Length of Pedicle Screws**

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
<b>Concave</b>									
Mean	28.5	30.4	30.5	30.5	31.6	31.7	32.5	33.9	34.0
SD	3.3	3.5	3.8	4.2	4.3	3.5	3.5	4.7	4.6
Min	22.9	24.0	23.3	21.3	25.0	25.2	25.8	26.2	22.0
Max	35.0	37.4	42.8	41.3	40.3	40.8	40.9	51.6	41.8
<b>Convex</b>									
Mean	29.2	30.7	30.3	29.4	29.0	30.2	29.9	30.2	31.6
SD	2.9	2.8	3.1	3.2	3.7	4.0	5.0	4.3	4.3
Min	23.6	24.5	22.4	21.8	21.2	22.4	19.1	23.0	23.3
Max	34.7	37.2	37.1	35.7	36.7	40.9	43.3	38.8	40.1

	T10	T11	T12	L1	L2	L3	L4	L5
<b>Concave</b>								
Mean	35.1	35.2	37.2	42.6	44.6	45.6	44.8	43.5
SD	4.1	3.6	4.0	4.5	5.2	3.9	3.9	6.1
Min	26.4	28.7	29.4	32.8	33.3	38.2	37.4	34.1
Max	43.8	48.5	46.9	53.4	59.1	54.0	52.4	52.7
<b>Convex</b>								
Mean	33.4	33.6	36.1	41.8	44.4	45.7	43.8	44.7
SD	3.8	5.6	4.6	4.8	5.1	3.8	3.5	4.9
Min	24.6	21.5	27.9	32.8	24.0	38.9	37.1	37.8
Max	41.6	51.7	50.5	54.9	54.5	53.2	49.9	51.5

**Table 3. Direction of Pedicle Screws**

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
<b>Concave</b>									
Mean	27.1	17.4	13.5	8.4	7.1	4.0	4.3	4.6	4.0
SD	5.8	5.8	3.8	6.2	5.5	5.2	5.0	5.5	5.4
Min	17.0	7.0	7.0	-9.0	-7.0	-10.0	-4.0	-4.0	-10.0
Max	39.0	36.0	20.0	18.0	17.0	16.0	14.0	15.0	16.0
<b>Convex</b>									
Mean	26.9	17.3	9.4	7.1	5.2	5.0	3.3	2.2	4.4
SD	4.8	4.1	4.1	4.0	4.8	5.1	4.9	4.8	6.1
Min	17.0	9.0	0.0	0.0	-4.0	-8.0	-7.0	-9.0	-10.0
Max	36.0	27.0	17.0	15.0	14.0	16.0	13.0	9.0	13.0

	T10	T11	T12	L1	L2	L3	L4	L5
<b>Concave</b>								
Mean	5.8	6.3	4.6	7.9	10.6	13.1	15.1	24.5
SD	5.7	4.8	4.7	5.0	3.6	4.8	4.5	10.1
Min	-12.0	-5.0	-3.0	-5.0	3.0	4.0	4.0	11.0
Max	19.0	18.0	20.0	18.0	19.0	22.0	23.0	42.0
<b>Convex</b>								
Mean	3.7	4.9	5.8	8.0	9.7	13.6	14.8	22.5
SD	5.0	5.1	6.5	5.4	5.0	4.3	4.1	12.3
Min	-10.0	-8.0	-15.0	-5.0	-4.0	2.0	9.0	0.0
Max	13.0	15.0	17.0	21.0	18.0	20.0	25.0	38.0

needs to be tilted for rod settlement and a multiaxial screw with a relative large head is mandatory. From our experience of 50 scoliosis surgeries done using the navigation system, pedicles too narrow for the straightforward technique were usually impracticable even with the anatomic technique. We did not try to simulate the anatomic trajectory because simulation of screw placement would have been too complicated. Future analysis of feasibility of using the anatomic trajectory is warranted.

Another solution might be to use the in-out-in technique. However, pull-out testing showed the extrapedicular screw had inferior pull-out strength compared with a transpedicular screw,<sup>11</sup> and the authors are doubtful of its strength and safety when a lateral force is exerted especially on the concave midthoracic side.

Though powerful correction force and maintenance by segmental pedicle screw instrumentation is very fas-

inating, surgeons need not to always use pedicle screws but can use other anchoring methods like hooks and wires when preoperative evaluation reveals narrow pedicles which are not appropriate for pedicle screw placement.

**Length and Direction**

Inappropriate length or direction of a pedicle screw can be more hazardous than inappropriate diameter. A screw directed too medially can put the spinal cord in jeopardy. A screw advanced too anteriorly or too laterally poses a potential risk of aorta injury. Vaccaro *et al* analyzed nonscoliotic thoracic spine and found that the aorta and the esophagus are at greatest risk of injury when a pedicle screw penetrates an anterior cortex of the vertebral body.<sup>4</sup> The present study showed 11% of the T4-T8 vertebrae did not accept a 25-mm length screw on the convex side. Though the middle thoracic vertebrae ac-

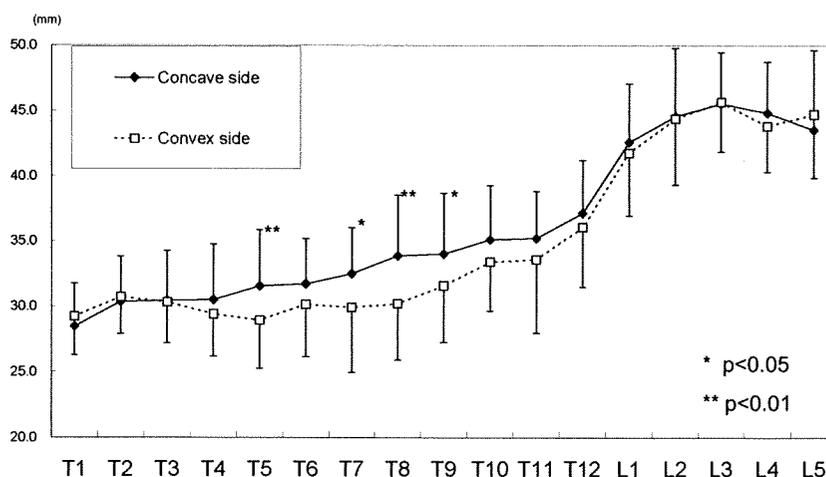


Figure 4. Length of pedicle screws.

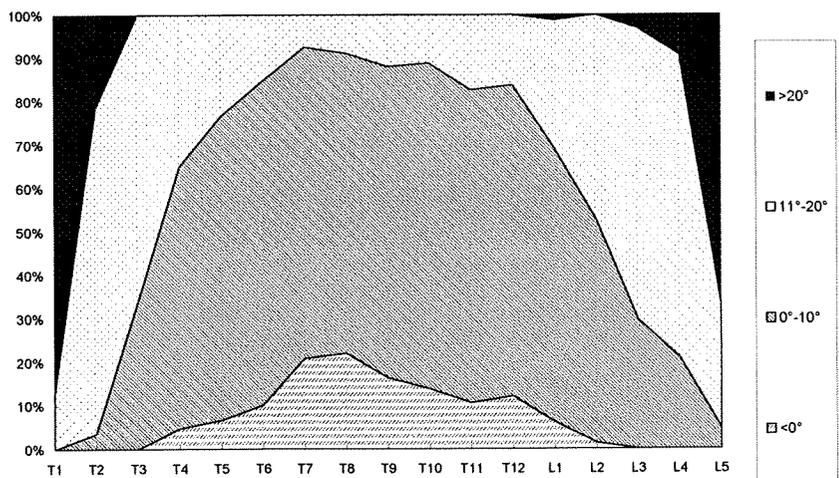


Figure 5. Distribution of angle of pedicle screws. Angle shows lowest value at T7–T8.

cept screws of this length, the aorta usually resides just lateral of the vertebral body on the left side.<sup>12</sup> Considering the lateral force exerted during a correction maneuver, special attention should be given to place screws on the concave side.

We designed a new abscissa-axis with which surgeons can estimate the direction from the explored spine in posterior surgery. The present study showed that 23% of screws at T7–T8 aimed in a lateral direction on the convex side from the perspective of the posterior spine. Large lateral tilt at T1–T2 pedicles in the present study suggested that multiaxial screws seem practical for smooth connection with adjacent screws.

#### Limitation

ICCs of length and angle were smaller than that of diameter in the repeatability test. As shown in a report of a funnel technique by Yingsakmonkol *et al*,<sup>13</sup> length and direction of a pedicle screw sometimes allows a range of values. Length may differ by several millimeters depending on selection of the insertion points because some of these points are determined at the base of a pedicle, and some at the transverse process. Because we wanted to simulate the same-screw placement as we actually use the navigation system, a more consistent method of measurement had not been considered.

#### Radiation Exposure by CT

Projected exposure dose by 1 CT is estimated to be 30 mGy in our university hospital. Our experience of pedicle screw placement with a navigation system by preoperative CT substantially decreased screw breach from 7% by free-hand technique to 2%. We believe that reduction of screw breach by the navigation system outweighs the additional exposure for patients.

In summary, 37% of T3–T9 concave pedicles were too small for a 4-mm diameter screw even with 25% expansion. At the middle thoracic spine on the concave side, the direction and length of a pedicle must be carefully determined. We recommend that surgeons consider combined use of various anchoring when preoperative

evaluation reveals that pedicles are narrow for screw placement.

#### Key Points

- We evaluated appropriate diameter, length, and direction of pedicle screws in patients with scoliosis by multiplanar reconstruction of CT.
- Thirty-seven percent of pedicles at T3–T9 on the concave side were too small for a 4-mm diameter screw even with expansion.
- Eleven percent of pedicle screws at T4–T8 on the convex side were less than 25 mm in length and 17% of screws at T7–T10 were placed in the lateral direction.
- Surgeons should not use pedicle screws when preoperative evaluation reveals that pedicles are too narrow for proper screw placement.

#### References

1. Catan H, Buluç L, Anik Y, et al. Pedicle morphology of the thoracic spine in preadolescent idiopathic scoliosis: magnetic resonance supported analysis. *Eur Spine J* 2007;16:1203–8.
2. Liljenqvist UR, Link TM, Halm HF. Morphometric analysis of thoracic and lumbar vertebrae in idiopathic scoliosis. *Spine* 2000;25:1247–53.
3. Liljenqvist UR, Allkemper T, Hackenberg L, et al. Analysis of vertebral morphology in idiopathic scoliosis with use of magnetic resonance imaging and multiplanar reconstruction. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84-A:359–68.
4. Vaccaro AR, Rizzolo SJ, Balderston RA, et al. Placement of pedicle screws in the thoracic spine. Part II: an anatomical and radiographic assessment. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77:1200–6.
5. O'Brien MF, Lenke LG, Mardjetko S, et al. Pedicle morphology in thoracic adolescent idiopathic scoliosis: is pedicle fixation an anatomically viable technique? *Spine* 2000;25:2285–93.
6. Xiong B, Sevastik B, Sevastik J, et al. Horizontal plane morphometry of normal and scoliotic vertebrae. *Eur Spine J* 1992;4:6–10.
7. Lenke LG, Betz RR, Harms J, et al. Adolescent idiopathic scoliosis: a new classification to determine extent of spinal arthrodesis. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83:1169–81.
8. Lehman RA Jr, Polly DW Jr, Kuklo TR, et al. Straight-forward *versus* anatomic trajectory technique of thoracic pedicle screw fixation: a biomechanical analysis. *Spine* 2003;28:2058–65.
9. Rinella A, Cahill P, Ghanayem A, et al. Thoracic pedicle expansion after pedicle screw placement in a pediatric cadaveric spine: a biomechanical analysis. Presented at the SRS 39th annual meeting, Buenos Aires, Argentina, 2004.

10. Yazici M, Pekmezci M, Cil A, et al. The effect of pedicle expansion on pedicle morphology and biomechanical stability in the immature porcine spine. *Spine* 2006;31:E826-9.
11. White KK, Oka R, Mahar AT, et al. Pullout strength of thoracic pedicle screw instrumentation: comparison of the transpedicular and extrapedicular techniques. *Spine* 2006;31:E355-8.
12. Sucato DJ, Duchene C. The position of the aorta relative to the spine: a comparison of patients with and without idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A:1461-9.
13. Yingsakmonkol W, Karaikovic E, Gaines RW. The accuracy of pedicle screw placement in the thoracic spine using the "funnel technique": part 1. A cadaveric study. *J Spinal Disord Tech* 2002;15:445-9.

Images in cardio-thoracic surgery  
Repair of the entire aorta and heart valves in a patient with  
Marfan syndrome

Tsuyoshi Taketani <sup>a,\*</sup>, Shunei Kyo <sup>a</sup>, Masaaki Kato <sup>b</sup>, Shinichi Takamoto <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Cardiothoracic Surgery, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo, Tokyo, 113-8655, Japan

<sup>b</sup> Department of Cardiovascular Surgery, Morinomiya Hospital, Osaka, Japan

Received 11 September 2008; received in revised form 15 October 2008; accepted 21 October 2008

**Keywords:** Marfan syndrome; Aortic aneurysm; Valve surgery

A 49-year-old woman with Marfan syndrome underwent replacement of the aortic arch as her seventh cardiovascular surgery. By this, total repair of the aorta and the heart valves except for pulmonary valve was completed (Fig. 1) without any serious complications. This is a rare case even for a Marfan patient.

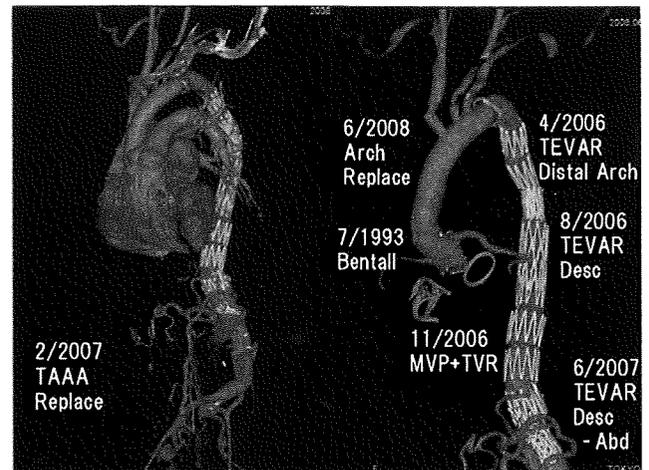


Fig. 1. Reconstructed CT image shows implanted artificial valves in aortic and tricuspid position, mitral annuloplasty ring, vascular grafts in the aortic root, ascending arch and abdominal aorta and both common iliac arteries, and stent-grafts in the descending and supra-celiac abdominal aorta. All grafts are patent, and no leak or endoleak is observed.

\* Corresponding author. Tel.: +81 3 5800 8654; fax: +81 3 5684 3989.  
E-mail address: ttaketa-ky@umin.ac.jp (T. Taketani).

## Adipose tissue-derived stem cells inhibit neointimal formation in a paracrine fashion in rat femoral artery

Masao Takahashi,<sup>1\*</sup> Etsu Suzuki,<sup>4\*</sup> Shigeyoshi Oba,<sup>1</sup> Hiroaki Nishimatsu,<sup>2</sup> Kenjiro Kimura,<sup>4</sup> Tetsuo Nagano,<sup>3</sup> Ryoza Nagai,<sup>1</sup> and Yasunobu Hirata<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Internal Medicine and <sup>2</sup>Urology, Faculty of Medicine, and <sup>3</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, Tokyo; and <sup>4</sup>Saint Marianna University School of Medicine, Kawasaki, Japan

Submitted 27 April 2009; accepted in final form 19 November 2009

**Takahashi M, Suzuki E, Oba S, Nishimatsu H, Kimura K, Nagano T, Nagai R, Hirata Y.** Adipose tissue-derived stem cells inhibit neointimal formation in a paracrine fashion in rat femoral artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H415–H423, 2010. First published November 25, 2009; doi:10.1152/ajpheart.00391.2009.—Subcutaneous adipose tissue contains a lot of stem cells [adipose-derived stem cells (ASCs)] that can differentiate into a variety of cell lineages. In this study, we isolated ASCs from Wistar rats and examined whether ASCs would efficiently differentiate into vascular endothelial cells (ECs) in vitro. We also administered ASCs in a wire injury model of rat femoral artery and examined their effects. ASCs expressed CD29 and CD90, but not CD34, suggesting that ASCs resemble bone marrow-derived mesenchymal stem cells. When induced to differentiate into ECs with endothelial growth medium (EGM), ASCs expressed Flt-1, but not Flk-1 or mature EC markers such as CD31 and vascular endothelial cadherin. ASCs produced angiopoietin-1 when they were cultured in EGM. ASCs stimulated the migration of EC, as assessed by chemotaxis assay. When ASCs that were cultured in EGM were injected in the femoral artery, the ASCs potently and significantly inhibited neointimal formation without being integrated in the endothelial layer. EGM-treated ASCs significantly suppressed neointimal formation even when they were administered from the adventitial side. ASC administration significantly promoted endothelial repair. These results suggested that although ASCs appear to have little capacity to differentiate into mature ECs, ASCs have the potential to secrete paracrine factors that stimulate endothelial repair. Our results also suggested that ASCs inhibited neointimal formation via their paracrine effect of stimulation of EC migration in situ rather than the direct integration into the endothelial layer.

vascular endothelial cells; endothelial repair

CELL-BASED THERAPY HAS BEEN recently applied to the field of cardiovascular medicine. Among a variety of stem or progenitor cells that can be used for regeneration of heart and blood vessels, endothelial progenitor cells (EPCs) and bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMMSCs) are the ones that are most popularly used in this field. Although EPCs were originally isolated from human peripheral blood using the hematopoietic stem cell marker CD34 for positive selection, they are believed to reside mainly in the bone marrow (1, 19). EPCs can differentiate into vascular endothelial cells (ECs) in vitro and stimulate angiogenesis in vivo through integration in the endothelial layer of new forming capillaries (1). EPCs that are induced to differentiate into ECs are engrafted in the endothelial layer and inhibit neointimal formation via stimula-

tion of EC regeneration (5). EPCs that are differentiated into ECs also form the endothelial layer on the surface of prosthetic grafts (5). BMMSCs have the potential to differentiate into mesenchymal tissues such as bone, cartilage, fat, and muscle (14). In addition to their capacity to differentiate into mesenchymal tissues, CD34-negative BMMSCs have been shown to differentiate into ECs (13). Furthermore, BMMSCs reportedly secrete paracrine factors that potentially stimulate angiogenesis (10). Bone marrow-derived cells have been used clinically to treat cardiovascular diseases and have turned out to be useful in some reports (22, 24). The problem in the clinical application of EPCs and BMMSCs is that bone marrow aspiration is usually necessary to prepare EPCs and BMMSCs. This procedure is somewhat painful for patients.

Recently, subcutaneous adipose tissue has been drawing much attention, because it contains a lot of mesenchymal stem cells that potentially differentiate into a variety of cell lineages including adipocytes, chondrocytes, osteocytes, and skeletal muscle (4). If these mesenchymal stem cells are useful for the regeneration of heart and blood vessels, adipose tissue will be a promising source of stem cells in the field of cardiovascular medicine, because it is easy to collect by local anesthesia. In fact, it has been reported that adipose-derived stem cells (ASCs) stimulate angiogenesis in the mouse hindlimb ischemia model (9, 11, 15, 16). However, the mechanism by which ASCs stimulate angiogenesis remains to be debated. ASCs promoted angiogenesis by being engrafted in the endothelial layer and stimulating neovascular formation (9, 15) or by producing angiogenesis-stimulating factors without integration into the endothelial layer (11). It also remains controversial whether ASCs can efficiently differentiate into ECs in vitro. Furthermore, it remains unclear whether ASCs can be efficiently integrated in the endothelial layer and inhibit neointimal formation.

In this study, we isolated ASCs from Wistar rats and examined whether ASCs would efficiently differentiate into ECs in vitro. We also examined whether ASCs would be engrafted in the endothelial layer and inhibit neointimal formation using a wire injury model of the rat femoral artery.

### MATERIALS AND METHODS

**Reagents.** Anti-CD34, anti-vascular endothelial (VE)-cadherin, anti-Flk-1, anti-Flt-1, and anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-CD31 antibody was obtained from ABR Affinity BioReagents (Golden, CO). Anti-CD29-FITC antibody was purchased from BioLegend (San Diego, CA). Anti-CD90 antibody was obtained from AbD Serotec (Oxford, UK). Anti-angiopoietin-1 (Ang-1) antibody was purchased from Abcam (Cambridge, MA), and human Ang-1 was obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN).

\* M. Takahashi and E. Suzuki contributed equally to this work.

Address for reprint requests and other correspondence: E. Suzuki, Inst. of Medical Science, St. Marianna Univ. School of Medicine, 2-16-1 Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki, 216-8512, Japan (e-mail: esuzuki-ky@umin.ac.jp).

Table 1. Primers used for real-time PCR analysis

Rat Flk1 sense	5'-TCTTTATTGTGCACTGCAGATAGAAA-3'
Rat Flk1 antisense	5'-GGACCGATGTGCCTGTGA-3'
Rat Flt1 sense	5'-TCGCCAGAAGTCGTATGGTTAA-3'
Rat Flt1 antisense	5'-GCACCGAATAGCCGACAGAT-3'
Rat CD31 sense	5'-GGCGTCTGTCCGGAATC-3'
Rat CD31 antisense	5'-AGAACTCCTGCACAGTGCAGTATT-3'
Rat VE-Cad sense	5'-GGTGAAGAAAGAAGAGGCAGACA-3'
Rat VE-Cad antisense	5'-CGTAGCCGTAGATGTCAGTGT-3'
Rat VEGF-A sense	5'-GAGGAAAGGAAAGGGTCAAAA-3'
Rat VEGF-A antisense	5'-CACAGTGAACGCTCCAGGATT-3'
Rat bFGF sense	5'-GTCAAACCTACAGCTCCAAGCAGAA-3'
Rat bFGF antisense	5'-AGGTACCGGTTCGCACACA-3'
Rat Ang-1 sense	5'-CAGGAGTTGGTGGTTTGATG-3'
Rat Ang-1 antisense	5'-TTTGCCTGCAGTGTAGAACATT-3'
Rat HGF sense	5'-CAATCCAGAGGTACGCTACGAA-3'
Rat HGF antisense	5'-TTTCACCGTTGCAGTTCATG-3'
Rat IGF-1 sense	5'-CCTACAAAGTCAGTCTGTTCCA-3'
Rat IGF-1 antisense	5'-TCCTTCTGAGTCTTGGGCATGT-3'
Rat GAPDH sense	5'-GTATGACTCTACCCAGGCAAGT-3'
Rat GAPDH antisense	5'-TTCCCGTTGATGACCAGCTT-3'

VE-Cad, vascular endothelial cadherin; bFGF, basic fibroblast growth factor; Ang-1, angiopoietin-1; HGF, hepatocyte growth factor.

**Cell culture.** ASCs were cultured from male Wistar rats as previously reported with slight modification (15). In brief, inguinal subcutaneous adipose tissue was excised and minced in phosphate-buffered saline (PBS) on ice. The minced tissue was then digested at 37°C for 1 h in PBS containing 2% bovine serum albumin and 2 mg/ml collagenase (Sigma, St. Louis, MO). The digested tissue was filtered through a 100- $\mu$ m nylon mesh and centrifuged at 600 g for 10 min. After lysis of red blood cells in 1 $\times$  lysis buffer containing (in mM) 154 NH<sub>4</sub>Cl, 14 NaHCO<sub>3</sub>, and 0.1 EDTA (pH 7.3), the pellets were plated in 100-mm dishes at a density of 30,000 cells/cm<sup>2</sup> in a 1:1 mixture of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and F12

medium containing 10% fetal bovine serum (FBS). Six hours after the cells were plated, the medium was changed to remove nonadherent cells. The adherent cells were cultured in DMEM-F12-10% FBS and split several times to expand the cells. Passages 2 to 3 were used for the experiments. To induce differentiation into ECs, ASCs were cultured in endothelial growth medium-2MV (EGM; Lonza Walkersville, Walkersville, MD) on fibronectin-coated dishes. EGM consists of endothelial basal medium-2 (Lonza Walkersville) containing 5% FBS plus growth factors such as epidermal growth factor, hydrocortisone, vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, basic fibroblast growth factor (bFGF), and insulin-like growth factor (IGF)-1. ASCs were also cultured on fibronectin-coated dishes in endothelial basal medium-2 containing 5% FBS (EBM) as the negative control. Human umbilical vein ECs (HUVECs) were purchased from Sanko-Junyaku (Tokyo, Japan) and cultured using HuMedia-EG (Kurabo, Osaka, Japan). Rat vascular smooth muscle cells (VSMCs) were cultured from rat thoracic aortas following the explant method, as previously described (17), and maintained in DMEM containing 10% FBS. NRK-52E cells, a cell line derived from rat renal tubular cells, were cultured in DMEM containing 5% FBS.

**Flow cytometry.** Cultured ASCs were trypsinized and incubated in a blocking buffer (PBS-containing 3% FBS) for 30 min on ice. Approximately 5  $\times$  10<sup>5</sup> cells were incubated with primary antibodies reactive to CD34, VE-cadherin, CD29, CD90, or isotype-matched control IgGs. After being washed, the cells were incubated with secondary antibodies coupled with FITC, when the primary antibodies were unlabeled. Following the wash, samples were analyzed with an EPICS XL flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

**RNA extraction and real-time PCR.** Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Gibco, Rockville, MD) according to the instructions provided by the manufacturer. Total RNA was subjected to reverse transcription using an Omniscript RT kit (Qiagen, Tokyo, Japan). The expression of a variety of genes including Flk-1, Flt-1, CD31, VE-cadherin, VEGF-A, bFGF, Ang-1, hepatocyte growth factor (HGF), IGF-1, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was examined

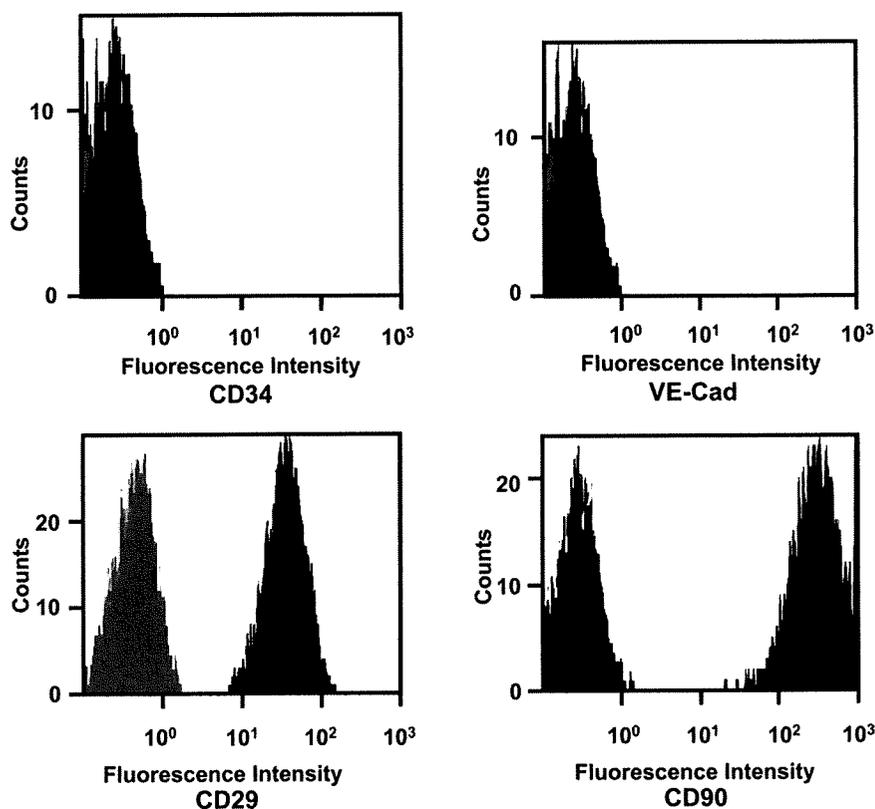


Fig. 1. Flow cytometry analysis of cell surface marker expressions in adipose-derived stem cells (ASCs). Specific fluorescence of CD34, vascular endothelial cadherin (VE-Cad), CD29, and CD90 (black-filled area) and nonspecific fluorescence derived from their isotype matched control IgGs (gray-filled area) are shown. Shown are representative results of 3 independent experiments.

by real-time PCR using an SYBR green dye. Primers used are listed in Table 1. Real-time PCR was performed using an ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA).

**Western blot analysis.** Western blot analysis was performed as previously described (21). To measure the contents of Ang-1 in culture medium, the culture medium was concentrated using Amicon Ultra-4 centrifugal filter devices (Millipore, Billerica, MA).

**Chemotaxis assay.** ASCs were cultured in EBM or EGM for 7 days, and the medium was changed to DMEM-0.2% FBS. The medium was collected after 12 h and used for chemotaxis assay. Chemotaxis assay was performed using a chemotaxis assay chamber according to the instructions provided by the manufacturer (Neuro Probe, Gaithersburg, MD). In brief, the medium collected from ASCs that contains chemoattractants was placed under the filter. HUVECs were suspended in DMEM-0.2% FBS at a density of  $1 \times 10^6$  cells/ml, and 25  $\mu$ l each of the cell suspension was placed on the filter. After 24 h, the upper side of the filter was scrubbed with a cotton swab and washed with PBS to scrape off cells attaching to the side. The lower side of the filter was fixed with 100% methanol, and the cells on the lower side were stained with hematoxylin. The cell number on the

filter was counted in three random high-power fields ( $\times 100$ ) in each well, and the average of the cell number was used for statistical analysis.

**Adenoviral infection.** A recombinant adenovirus that expresses green fluorescence protein (AdGFP) was obtained from Quantum Biotechnologies (Montreal, Canada). ASCs were infected with AdGFP at a multiplicity of infection of 40 and used for in vivo experiments.

**Wire injury model.** All procedures involving experimental animals were approved by the Institutional Committee for Animal Research of the Tokyo University. Transluminal mechanical injury to rat femoral artery was performed as previously described (18). Male Wistar rats (8 to 10 wk old) were anesthetized with pentobarbital sodium injected intraperitoneally, and a groin incision was made under a surgical microscope. A guide wire (0.46 mm diameter) was introduced through a small muscular branch of the femoral artery proximally to the aortic bifurcation and withdrawn. ASCs cultured in EBM or EGM ( $10^6$  cells) for 7 days were injected into the femoral artery and incubated for 30 min with the proximal and distal sides of the artery clamped. In

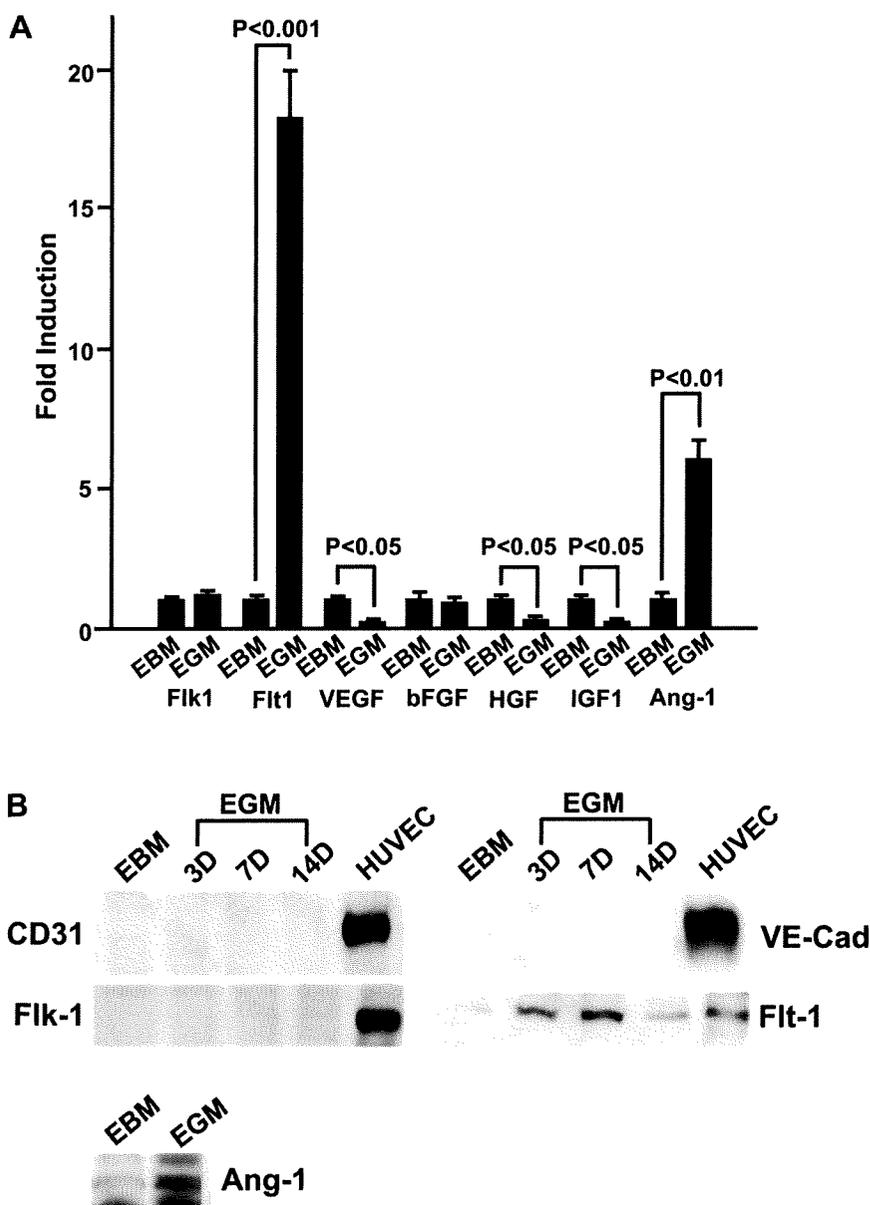


Fig. 2. A: real-time PCR analysis of mRNA expression in ASCs. ASCs were cultured in endothelial basal medium (EBM) or endothelial growth medium (EGM) for 7 days, and total RNA was extracted for real-time PCR analysis. Expression of GAPDH was used as the internal control ( $n = 5$  experiments). VEGF, VEGF-A; bFGF, basic fibroblast growth factor; HGF, hepatocyte growth factor. B: expression of endothelial cell-specific markers and production of angiopoietin-1 (Ang-1) in ASCs. ASCs were cultured in EBM for 7 days or in EGM for the indicated periods. Protein extracts were used for Western blot analysis. To detect Ang-1 in culture medium, ASCs were cultured in EBM or EGM for 7 days, and the medium was replaced with DMEM-0.2% FBS. The medium was harvested after 12 h and concentrated for Western blot analysis. Shown are representative results of 3 independent experiments. HUVEC, human umbilical vein endothelial cell; 3D, 3 days; 7D, 7 days; 14D, 14 days.