

Thesis

急性冠症候群を疑う胸痛で経過観察を必要とする患者における
血流依存性血管拡張測定の意義

国際医療センター 心臓内科

米田 修平

【緒言】血流依存性血管拡張(FMD: Flow-mediated vasodilation)は、超音波診断装置を用いて血管内皮機能を非侵襲的に計測する手法として普及している。特に最近、我が国において開発されたFMD測定に特化した超音波装置 UNEXEF18Gにより、半自動的に測定することが可能となり、再現性が改善した。FMDと冠危険因子との関連性について様々な研究が行われている。しかし、急性冠症候群(ACS: Acute coronary syndrome)とFMDとの関連性は十分に研究されていない。そこで我々は、胸痛で来院しACSが疑われた患者のうち、緊急の冠動脈造影あるいは治療を要する症例を除外した患者のFMDを測定し、ACSにおけるFMD測定の意義を前向きに検討した。

【方法】対象は、胸痛を主訴に来院し、ACSが疑われ、FMD測定が可能であった41例(男性26例、女性15例、平均年齢 65 ± 11 歳)である。超音波診断装置はUNEXEF18G(41例)を使用し、来院後48時間以内にFMDを測定した。ACSの最終診断は主に冠動脈造影によって行われた。

【結果】FMDはACS群($n = 10$)と非ACS群($n = 31$)でともに低値を示し、ACS群は非ACS群と比較し有意に低値を示した($2.0 \pm 1.0\%$ vs. $3.6 \pm 2.7\%$, $P = 0.01$)。ACSの診断特性の評価においてFMDのカットオフポイントを4.1%とし、4.1%未満を陽性とした場合にACSの陰性予測値が高値を示した(感度100%, 特異度39%, 陰性予測値100%, 陽性予測値34%; $P = 0.02$)。

【結論】ACS群では非ACS群に比してFMDが低値を示し血管内皮機能の障害が疑われた。FMD4.1%以上では胸痛患者においてACSの可能性を否定できる。

緒言

急性冠症候群(ACS: Acute coronary syndrome)は、冠動脈粥腫の破綻、びらんと血栓形成を基盤として急性心筋虚血を呈する臨床症候群であり、不安定狭心症から心臓性急死までを包括する広範な疾患概念である¹⁾。血管内皮機能障害は、動脈硬化の初期段階から生じる血管の障害とされる^{2,3)}。血管内皮障害は一酸化窒素の活性を抑制することが報告されている⁴⁾。一酸化窒素は炎症の抑制に関与し、血管内皮由来の様々な炎症性メディエーターや接着分子を減少させることにより、動脈硬化プラークの不安定化を抑制している^{5,6)}。ACSにおいては、血管内皮障害は抗炎症機能や抗酸化ストレス機能を抑制することにより血小板機能の亢進や冠動脈プラークの不安定化の原因となることが報告されている⁷⁾。

血流依存性血管拡張反応(FMD: flow-mediated dilation)は、血流増加によるずり応力が血管内皮細胞に働き、一酸化窒素に代表される血管拡張物質が放出されることによる血管拡張反応であり、血管内皮機能の指標と考えられている⁸⁾。FMDは、超音波診断装置を用いて非侵襲的に測定できる。ところが、生理学的要因や検者の熟練度により再現性が低いことが問題とされ、これまで心血管病のリスク評価には推奨されていなかった⁹⁾。近年我が国において、FMD測定に特化した超音波装置 UNEXEF18Gが開発され、半自動的に測定することが可能となり、再現性が改善したことから冠危険因子との関連性について様々な研究が行われている。ACSでは血管内皮機能が障害されていることが報告されているが、ACSとFMDとの関連性は十分に研究されていない。

そこで我々は、胸痛で来院しACSが疑われた患者のうち緊急の冠動脈造影あるいは治療を要する症例を除外した患者のFMDをUNEXEF18Gを用いて測定し、

ACSでFMDが低下するかどうかを検討した。また、ACSを診断する前にFMDを測定し、ACSの鑑別にFMDが有用かどうかを検討した。

対象と方法

1. 対象

対象は、2011年6月から2013年6月の間に、ACSを示唆する胸痛¹⁰を主訴として、発症後約1時間から2か月の間に当施設を受診した20歳以上の患者のうち、FMD測定が可能であった41例(男性26例、女性15例、平均年齢65±11歳)である。冠動脈疾患の家族歴あるいは冠危険因子、心電図変化(STの上昇や低下など)、生化学的マーカーの上昇(トロポニンI, CK, CK-MB)の有無に関わらず対象に含めた。

除外症例は、緊急の冠動脈造影(CAG: Coronary angiography)あるいは治療を要する症例や血管拡張薬投与中の症例、重症心不全例、冠動脈バイパス術後の症例、インフォームド・コンセントの得られない症例である。

尚、本研究は、当施設のIRB(アイ・アール・ビー)で承認(申請番号:11-044)され、全ての対象患者に文書による同意を得て行った。

2. 来院時の病態評価

来院時ACSが疑われた患者に対し、年齢、性別、リスクファクター、薬剤の使用、心拍数、血圧、血液検査、心電図変化、TIMIリスクスコアについて調査し、ただちにリスクの層別化を行い、それぞれのリスクに応じて酸素投与や薬物加療などの初期治療あるいは経過観察を開始した。この時点で、緊急性の高い症例を除外し、胸痛が治まっており比較的安定した症例に対して、冠動脈造影が施行される前に、外来あるいは病棟内でFMDを施行した(図1)。冠動脈造影は来院後48時間以内に行われた。

3. FMD測定

血管不全研究会血管機能測定標準化委員会による標準化案¹²に従いFMD測定を行った。すなわち、静かで薄暗く温度調節のきいた環境で、原則として朝空腹時に行い、やむをえず午後測定する場合には、軽い軽食にとどめ検査前最低4時間は絶食とした。タバコ・カフェイン飲料は6時間以上休止した。検査前10分間以上の安静臥床後、まず血圧測定を行い低血圧や徐脈がないことを確認した。

超音波診断装置は、UNEXEF18G(41例)を使用し、血管径の計測は自動計測法で行った。

前腕部を5分間駆血し、駆血前および解除後の上腕動脈の血管径を、超音波診断装置を用いて測定した(図2)。測定部位は、上腕肘窩より3-15 cm中樞側の上腕動脈とした。駆血前の血管径をベース径として、駆血解除後40～60秒後の最大拡張時の血管径を測定し、その変化率をFMD(%)とした。尚、Goriらが

報告したL-FMC(Low-flow-mediated constriction)が認められた場合^{13,14}、すなわち、圧迫解除後の血管径が安静時よりも小さい場合は、奥村らの報告¹⁵と同様に、駆血解除直後の血管径をベース径としてFMDを求めた。駆血時のカフ圧は収縮期血圧に50 mmHgを加えたものとした。

血管径の計測箇所は、BモードとAモードの両方で自動トラッキングシステムを利用し、内膜間距離を測定した。内膜の描出不明瞭などにより測定困難の場合には、外膜間距離を測定した。

4. ACSの診断

25例でCAGを行い、器質的病変が認められたものをACS群、器質的病変がないものを非ACS群とした。CAGで75%以上の狭窄あるいは閉塞が認められたものを器質的病変とした。プラークの破綻や血栓の有無に関わらず、器質的病変による不安定狭心症あるいは急性心筋梗塞の患者をすべてACS群に含めた。

ただし、CAGで器質的病変があっても、以前から狭窄度に変化がみられず、冠血流予備量比(FFR: Fractional flow reserve)が正常あるいは心筋負荷シンチグラフィで誘発虚血が認められず、胸痛の原因がACSではないと考えられた2症例は安定した冠動脈疾患(CAD: Coronary artery disease)とみなし、非ACS群に含めた。

一方CAGを施行しなかった16症例では、その後の症状や心電図、生化学的マーカーの所見の変化、心臓超音波、冠動脈CT、心筋シンチグラフィなどにより総合的に診断した。

合併症のため冠動脈造影のリスクが高く、酸素投与や薬物療法のみで症状が安定したため冠動脈造影を待機的に施行した急性心筋梗塞の1症例や、本人が冠動脈造影を拒否したため冠動脈造影が施行されなかった不安定狭心症の1症例は対象に含めた。

5. 統計解析

母平均の差の検定にはスチューデントのt検定を用いた。独立性の検定には χ^2 検定あるいはFisherの直接法を用いた。最適なカットオフ値の算出には、ROC曲線やYouden indexを用いた。感度・特異度の算出にはクロステーブルを用いた。

統計解析にはSPSS version. 15.0(SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)を使用した。結果は平均±SDで示し、有意水準は危険率5%未満とした。

結果

ACSと診断した10例(ACS群)とACSを否定した31例(非ACS群)における臨床データと検査結果を示す(表1)。年齢、性別、リスクファクター、薬剤の使用、心拍数、血圧、血液検査、心電図変化、TIMIリスクスコアには両群間で有意差は認められなかった。上腕動脈の血管径、血流速度、血流量はいずれも両群間で

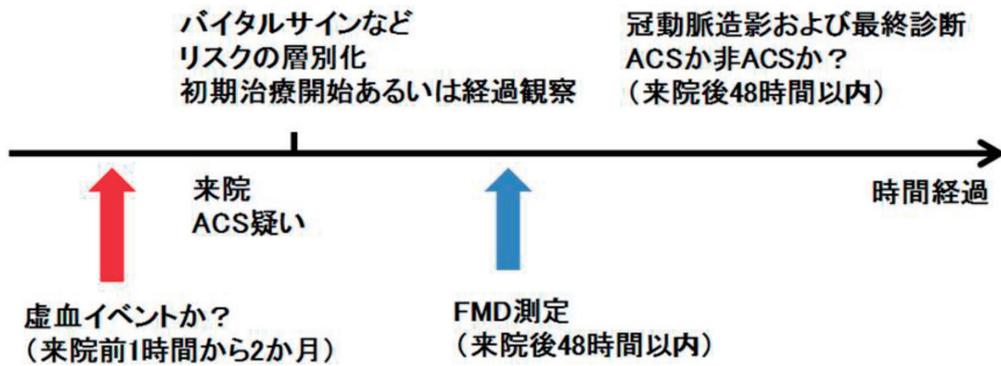


図 1. ACSを疑う症例に対するFMD測定のプロトコール。来院後ただちにリスクの層別化を行い、それぞれのリスクに応じて酸素投与や薬物加療などの初期治療あるいは経過観察を開始した。この時点で、緊急性の高い症例を除外し、胸痛が治まり比較的安定した症例に対して、冠動脈造影が施行される前に、外来あるいは病棟内でFMDを施行した。



図 2. A: FMD測定の実際の様子。カフで前腕を駆血し、圧迫解除後の上腕動脈の拡張反応をエコーで観察した。B: 超音波診断装置 UNEXEF18GによるFMDの自動解析。Bモードで上腕動脈の長軸像と短軸像を同時に描出することで、常に血管壁に垂直な断面像を維持できるように探触子が自動的に動き、Aモードで内膜間距離をトラッキングするシステム。

有意差はなかった。FMDは両群ともに低値を示し、ACS群は非ACS群と比較し有意に低値を示した($2.0 \pm 1.0\%$ vs. $3.6 \pm 2.7\%$, $P = 0.01$) (図3, 表2)。

FMDの診断特性を評価するためのROC曲線を用いた解析では、Youden indexによる最適なカットオフ値は4.1%だった。このカットオフ値に基づいて4.1%未満を陽性とし、クロステーブルを用いた解析を行ったところ、ACSの陰性予測値が高値を示した(感度100%, 特異度39%, 陰性予測値100%, 陽性予測値34%; $P = 0.02$) (表3)。

考 察

これまでACSとFMDの関連性についていくつか報告されている。Careriらは、非ST上昇型ACS患者の発症早期におけるFMDを測定し、安定CAD群よりも有意に低値であること($2.1 \pm 1.2\%$ vs. $4.8 \pm 1.9\%$, $P < 0.001$)を報告している¹⁰⁾。我々の研究では、ACS群においてFMDは $2.0 \pm 1.0\%$ であり、Careriらの研究と同様に低値だった。

ただしCareriらの研究は、血管拡張薬使用例を除外

表 1. ACS群と非ACS群における患者背景および検査結果の比較

	ACS (n=10)	非ACS (n=31)	P値
年齢, 歳	66±11	65±11	0.77
男性, n (%)	6(60)	20(65)	0.54
冠危険因子			
高血圧症, n (%)	8(80)	21(68)	0.38
高脂血症, n (%)	5(50)	16(52)	0.61
糖尿病, n (%)	4(40)	7(23)	0.25
喫煙, n (%)	5(50)	15(48)	0.61
薬歴			
スタチン, n (%)	3(30)	13(42)	0.39
β遮断薬, n (%)	3(30)	7(23)	0.46
ARB, n (%)	5(50)	12(39)	0.39
ACE-I, n (%)	0(0)	1(3)	0.76
Ca拮抗薬, n (%)	4(40)	15(48)	0.46
アスピリン, n (%)	5(50)	10(32)	0.26
心拍数 (回/分) *	66±11	68±12	0.53
血圧*			
収縮期血圧 (mmHg)	137±17	132±16	0.38
拡張期血圧 (mmHg)	77±11	81±10	0.25
血液検査**			
Cr (mg/dL)	1.3±1.9	1.2±1.5	0.76
CRP (mg/L)	0.1±0.1	0.9±2.0	0.24
Trop-I (ng/mL)	0.01±0.03	0.03±0.56	0.27
心電図変化**	4(33)	6(17)	0.30
TIMIリスクスコア	2.4±1.0	1.8±1.2	0.21

平均値±SD, n (%)を示す。ACS = acute coronary syndrome ; ARB = angiotensin II receptor blockers ; ACE-I = angiotensin-converting enzyme inhibitors ; CRP = C-reactive protein ; TIMI = thrombolysis in myocardial infarction. 心電図変化：少なくとも0.5 mm以上のST上昇または低下。* FMD測定時の所見。** 来院時の所見。

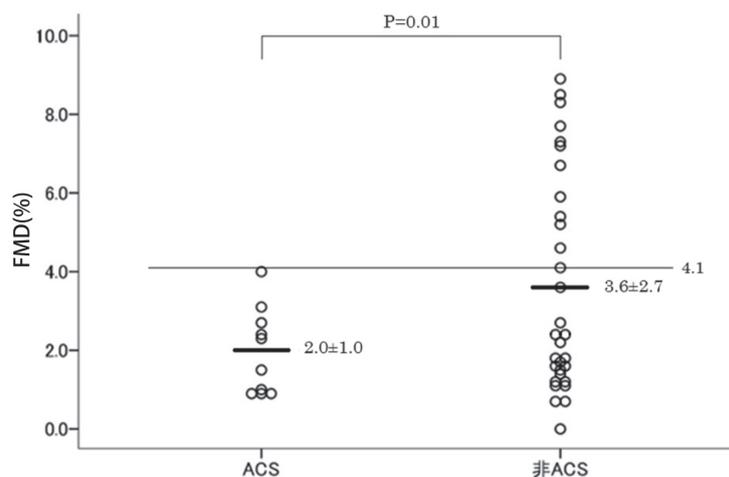


図 3. 散布図によるACS群と非ACS群におけるFMDの比較. FMDは両群ともに低値を示し, ACS群は非ACS群と比較し有意に低値を示した(2.0±1.0% vs. 3.6±2.7%, P = 0.01). 太字横線は平均値. 細字横線は統計的に算出したACS診断におけるFMDのカットオフ値.

表 2. 上腕動脈の血管径および血流の測定結果

		ACS (n=10)	非ACS (n=31)	P値
血管径	ベースラインの上腕動脈径 (mm)	4.55±0.76	4.16±0.86	0.22
	最大拡張時の上腕動脈径 (mm)	4.64±0.78	4.31±0.82	0.28
	FMD (%)	2.0±1.0	3.6±2.7	0.01
血流速度	ベースラインの血流速度 (cm/s)	14.1±9.6	12.5±11.2	0.70
	最大血流速度 (cm/s)	40.0±27.4	39.2±28.9	0.94
	血流速度増大率 (倍)	2.75±0.86	3.43±1.73	0.12
血流量	ベースラインの血流量 (cm ³ /s)	2.2±1.5	1.9±2.1	0.68
	最大血流量 (cm ³ /s)	6.6±4.5	6.3±5.7	0.86
	血流量増大率 (倍)	2.9±0.9	3.7±2.0	0.07

血管径, 血流速度, 血流量はいずれも両群間で有意差はなかった. FMDは両群ともに低値を示し, ACS群は非ACS群と比較し有意に低値を示した(2.0±1.0% vs. 3.6±2.7%, P=0.01).

表 3. クロステープルを用いたACSにおけるFMDの診断特性の評価

		ACS		合計
		あり	なし	
FMD	陽性 (4.1%未満)	10	19	29
	陰性 (4.1%以上)	0	12	12
合計		10	31	41

Youden indexによりカットオフ値を4.1%とし, FMD4.1%未満を陽性とした場合にACSの陰性予測値が高値を示した(感度100%, 特異度39%, 陰性予測値100%, 陽性予測値34%; P=0.02).

した場合にはもっと高い値が出た可能性がある. その理由は, FMD測定の標準化案¹²⁾には特に記載されていないことだが, FMD測定において, 血管拡張薬使用例では駆血前に血管がすでに拡張している, 本来の内皮機能を正確に反映していない可能性があるからである. 本研究では血管拡張薬使用例を除外しているので, Careriらと同様の結果が得られたとしても, 我々の方がより生理的な状態下における内皮機能障害を評価していると考えられる. また, Careriらの研究では, 超音波装置での血管の描出や血管径の計測を, 本研究のように自動計測法ではなく, 従来の手動法を用いて行っているため, 再現性や客観性に関する問題を内包している.

ACS発症早期に血管内皮機能障害をきたすメカニズムは未だ十分には解明されていないが, 各種バイオマーカーを用いてACS発症早期における血管内皮機

能障害について研究されている. FMDと負の相関があり, 血管内皮機能障害の代替マーカーとして知られているROCK (Rho-associated kinases) 活性¹⁷⁾を用いた検討では, ACS発症早期にROCK活性が亢進していることが報告されている¹⁸⁾. 同様に血管内皮機能と負の相関がある末梢血単球TLR4 (Toll-like receptor 4) やCD144陽性血管内皮細胞由来微小粒子(CD144-EMP: Endothelium-derived microparticles)は^{19,20)}, ACS患者あるいはACS早期の患者において高値であり, 安定狭心症の患者と比較して血管内皮機能障害が有意に強いことが報告されている^{21,22)}. Careriらは, ACS発症3か月後にFMDを再測定し, 安定CAD群と同レベルまで改善することを報告している¹⁶⁾. これらの報告は, ACSの発症早期には血管内皮機能障害が一時的に増悪していることを示唆しているが, 本研究では慢性期で測定しておらず, ACSにおけるFMDの低下が発症早期だけに認められるものであるかどうかについてはさらなる検討が必要である.

ACS診断の新たなバイオマーカーとして知られる高感度CRP (C-reactive protein) は, TLR4と同様にACS患者で高値を示すが, 白木らは, TLR4は高感度CRPが低値のACSに限定した場合でも高値を示し, CADの活動性を反映するマーカーとして高感度CRPよりもより正確であることを報告している²³⁾. TLR4は, 微生物抗原の受容体タンパクであり, 様々な細胞内シグナルを活性化させ炎症反応を引き起こすことにより動脈硬化進展の原因となり^{24,25)}, 頸動脈硬化プラークには正常血管と比較して発現量が多いことが報告されている²⁶⁾. 白木らは, 末梢血のTLR4測定は高感度CRP測定と比し局所的な動脈硬化性疾患に対する感度が高いことが示唆されることを報告している²³⁾. 本研究においてACS群は, CRPやトロポニンにはほとんど異常がなく, 比較的安定した

ACSだったことから、仮にACS群において高感度CRPを測定したとすると比較的low値を示す症例が多かったことが予想される。このような症例では、末梢血TRL4は高値を示す可能性があると考えられる。血管内皮機能障害やACS発症のメカニズムは非常に複雑であり、本研究で各バイオマーカーの関与について分子レベルで具体的に考察することには限界があるが、今後の研究課題として興味深い。

FMDの正常値は規定されていないが、藤井らの報告では、上腕動脈の解剖学的変異を有する13例を除いた健康な成人200例(男性154例, 29 ± 8歳)におけるFMDの平均値は7.0 ± 1.3%である²⁷⁾。

本研究において非ACS群のFMDは、ACS群より高く、正常例よりも低い傾向を示した。その原因として以下の4つの理由が考えられる。

まず第一に、この群は全例が胸痛を有する不安定な症例であり、FMD測定時あるいは測定前に強いストレスがあり、その影響が考えられる。ストレスにより一過性のFMDの低下が生じる(5.0 ± 2.1% vs. 2.3 ± 2.4%, $P < 0.01$)と報告されている²⁸⁾。

2番目の原因として、FMDは心房細動でも低下することが報告されており²⁹⁾、今回我々の研究では非ACS群31例中、心房細動が2例含まれていることから、正常例に比し低い値を示した可能性がある。

また、血管内皮機能障害は、動脈硬化の初期段階で認められることが知られており³⁾、FMDは、動脈硬化の形態的变化が出る前に血管内皮機能障害を評価することが可能なため、早期動脈硬化の指標として臨床的に用いられている。動脈硬化の危険因子である加齢・高血圧・糖尿病・喫煙・男性は、それぞれFMD低下の原因であることが報告されている³⁰⁾。したがって、第3の原因として今回我々の研究では、非ACS群でもACS群と同様にこれらの危険因子を多く有している(表1)ことから、正常例に比し低い値を示した可能性が考えられる。

また、安定CADでもFMDはlow値を示すとされる。Papageorgiouらは、安定CADを有する群と有さない群とでFMDを比較し、前者で有意にlow値であること(3.9 ± 2.4%, vs. 6.3 ± 3.2%, $P < 0.001$)を報告している³¹⁾。松島らは、CADの重症度(病変枝数)とFMDとの関連を検討し、病変枝数が増えるとFMDが低下し、0枝で8.0 ± 3.4%, 1枝で4.5 ± 3.1%, 2枝で2.7 ± 1.7%, 3枝で1.6 ± 2.2%であることを報告している³²⁾。これらより、第4の原因として、今回の我々の研究では、経皮的冠動脈形成術施行歴のある2症例を含めて安定CADが非ACS群に5症例含まれており、そのために正常例に比してlow値を示した可能性が考えられる。

(本研究の意義)

本研究では、胸痛を主訴としACSが疑われた患者のうち、緊急の冠動脈造影あるいは治療を要する症例を

除外した患者においてUNEXEF18Gを用いてACS診断前にFMDを測定した。ACS群でFMDがlow値を示したことはこれまでの報告と同様であり、ACSにおいて血管内皮機能が障害されることが示唆される。

ACSの診断特性の評価において、FMDのカットオフポイントを4.1%とし、4.1%未満を陽性とした場合にACSの感度、陰性予測値が高値を示した。したがって、FMD4.1%以上ではACSを否定できる可能性が示唆され、ACSの除外診断の一助として超音波診断装置を用いたFMD測定が有用であると考えられる。

本研究では来院時の病態評価の段階で多くの症例が除外され、最終的に対象となった症例は、ACSを疑う胸痛で受診したものの来院時には胸痛が治まっておき、心電図や生化学的心筋マーカーが決定的な異常を示さず、ACSの診断に経過観察や精査を要する症例¹¹⁾であった。実臨床において、このような症例の診断は必ずしも容易ではなく、非侵襲的に施行可能なFMD測定がACSの除外診断の一助となり得ることは、臨床的意義があると思われる。

(本研究の限界点)

典型的なACSの多くは除外項目に当てはまるため、今回対象となったのはACSの中でも比較的安定した症例に限られ、症例数が少ないことは本研究の限界点と考えられる。

結 論

ACSが疑われた患者のうち、緊急の冠動脈造影あるいは治療を要する症例を除外し、最終的にACSと診断された患者において、ACSと診断されなかった患者と比してFMDがlow値を示し、血管内皮機能が障害されていることがわかった。また、FMD4.1%以上では胸痛患者においてACSを否定できる可能性が示唆された。

利益相反

本研究に関連し、申告すべき利益相反はない。

謝 辞

稿を終えるに当たり、ご指導ご高閲を賜りました埼玉医科大学国際医療センター心臓内科学の松村誠准教授、松本万夫教授、西村重敬教授の御厚意に深く感謝いたします。

この内容の一部は第60回日本心臓病学会学術集会(2012年9月、金沢)にて発表した。

引用文献

- 1) Ogawa H. Pathophysiology of acute coronary syndromes. *J Cardiol* 1999;33(Suppl 1):9-16.
- 2) Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N*

- Engl J Med 1999;340:115-26.
- 3) Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF Jr, Vita JA. The clinical implication of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;42(7):1149-60.
 - 4) Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ifling K, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 2003;9:1370-6.
 - 5) Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies, I. *Circulation* 2003;108:1664-72.
 - 6) Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies, II. *Circulation* 2003;108:1772-8.
 - 7) Lerman A, Zeiher AM. Endothelial function: cardiac events. *Circulation* 2005;111(3):363-8.
 - 8) Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992;340(8828):1111-5.
 - 9) Greenland P, Alpert JS, Beller GA, Benjamin EJ, Budoff MJ, Fayad ZA, et al. 2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults. *Circulation* 2010;122(25):e584-636.
 - 10) 山口徹, 一色高明, 井野隆史, 小川久雄, 木村剛, 住吉徹哉, 他. 急性冠症候群の診療に関するガイドライン(2007年改訂版). *Circulation Journal* 2007;71(Suppl IV).
 - 11) Anderson JL, Adams CD, Antoman EM, Bridges CR, Califf RM, Casey DE Jr, et al. ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-Elevation myocardial infarction. *Circulation* 2007;116(7):e148-304.
 - 12) 松岡秀洋, 植田真一郎, 東幸仁, 野出孝一. 心血管病サロゲートマーカーとしてのFlow-Mediated Vasodilation測定とその標準化案. *臨床薬理* 2007;38(5):305-9.
 - 13) Gori T, Dragoni S, Lisi M, Di Stolfo G, Sonnati S, Fineschi M, et al. Conduct artery constriction mediated by low flow a novel noninvasive method for the assessment of vascular function. *J Am Coll Cardiol* 2008;51(20):1953-8.
 - 14) Gori T, Grotti S, Dragoni S, Lisi M, Di Stolfo G, Sonnati S, et al. Assessment of vascular function: flow-mediated constriction complements the information of flow-mediated dilatation. *Heart* 2010;96(2):141-7.
 - 15) Okumura H, Yamada S, Kono Y, Shimizu Y, Nitobe S. Arterial vasoconstriction mediated by cuff inflation affects the test-retest reliabilities of percent flow-mediated dilation. *J Jpn Coll Angiol* 2011;51:203-8.
 - 16) Careri G, Nerla R, Di Monaco A, Russo G, Stazi A, Villano A, et al. Clinical correlates and prognostic value of flow mediated dilation in patients with non-ST segment elevation acute coronary syndromes. *Am J Cardiol* 2013;111(1):51-7.
 - 17) Soga J, Noma K, Hata T, Hidaka T, Fujii Y, Idei N, et al. Rho-associated kinase activity, endothelial function, and cardiovascular risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31(10):2353-9.
 - 18) Dong M, Liao JK, Yan B, Li R, Zhang M, Yu CM. A combination of increased Rho kinase activity and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide predicts worse cardiovascular outcome in patients with acute coronary syndrome. *Int J Cardiol* 2013;167(6):2813-9.
 - 19) Liang CF, Liu JT, Wang Y, Xu A, Vanhoutte PM. Toll-like receptor 4 mutation protects obese mice against endothelial dysfunction by decreasing NADPH oxidase isoforms 1 and 4. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33(4):777-84.
 - 20) Koga H, Sugiyama S, Kugiyama K, Watanabe K, Fukushima H, Tanaka T, et al. Elevated levels of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(10):1622-30.
 - 21) Fukushima R, Soejima H, Fukunaga T, Nakayama M, Obe Y, Oshima S, et al. Expression levels of toll-like receptor genes in coronary atherosclerotic lesions of patients with acute coronary syndrome or stable angina pectoris. *Circ J* 2009;73(8):1479-84.
 - 22) Nozaki T, Sugiyama S, Koga H, Sugamura K, Ohba K, Matsuzawa Y, et al. Significance of a multiple biomarkers strategy including endothelial dysfunction to improve risk stratification for cardiovascular events in patients at high risk for coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2009;54(7):601-8.
 - 23) Shiraki R, Inoue N, Kobayashi S, Ejiri J, Otsu K, Honjo T, et al. Toll-like receptor 4 expressions on peripheral blood monocytes were enhanced in coronary artery disease even in patients with low C-reactive protein. *Life Sci* 2006;80(1):59-66.

- 24)Shor A, Kuo CC, Patton DL. Detection of Chlamydia pneumonia in coronary arterial fatty streaks and atheromatous plaques. *SouthAfrican Medical Journal* 82(3)158-61.
- 25)Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunology Letters* 85(2)85-95.
- 26)Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation* 2002;105(10):1158-61.
- 27)Fujii Y, Teragawa H, Soga J, Idei N, Fujimura N, Maruhashi T, et al. Flow-mediated vasodilation and anatomical variation of the brachial artery (double brachial artery) in healthy subjects and patients with cardiovascular disease. *Circ J* 2013;77(4):1073-80.
- 28)Ghiadoni L, Donald AE, Cropley M, Mullen MJ, Oakley G, Taylor M, et al. Mental stress induces transient endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 2000;102(20):2473-8.
- 29)Shin SY, Na JO, Lim HE, Choi CU, Choi JI, Kim SH, et al. Improved endothelial function in patients with atrial fibrillation through maintenance of sinus rhythm by successful catheter ablation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2011;22(4):376-82.
- 30)Maruhashi T, Soga J, Fujimura N, Idei N, Mikami S, Iwamoto Y, et al. Relationship between flow-mediated vasodilation and cardiovascular risk factors in a large community-based study. *Heart* 2013;99(24):1837-42.
- 31)Papageorgiou N, Tousoulis D, Miliou A, Hatzis G, Kozanitou M, Androulakis E, et al. Combined effects of fibrinogen genetic variability on atherosclerosis in patients with or without stable angina pectoris: Focus on the coagulation cascade and endothelial function. *Int J Cardiol* 2013;168(5):7.
- 32)Matsushima Y, Takase B, Uehata A, Kawano H, Yano K, Ohsuzu F, et al. Comparative predictive and diagnostic value of flow-mediated vasodilation in the brachial artery and intima media thickness of the carotid artery for assessment of coronary artery disease severity. *Int J Cardiol* 2007;117(2):165-72.